

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**Antioksidacijski potencijal fenola
izoliranih iz gloga (*Crataegi folium
cum flore*) primjenom ultrazvuka**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, te u Laboratoriju za tehničku termodinamiku na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Branke Levaj te uz pomoć dr. sc. Ivone Elez Garofulić i dr. sc Filipa Dujmića.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IT-PE-FF)“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem svim kolegama i kolegicama Laboratorija za procese konzerviranja i preradu voća i povrća, te Laboratorija za tehnološke operacije koji su na bilo koji način pomogli pri izvođenju ovog rada, a posebice hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Branki Levaj te dr. sc.

Ivoni Elez Garofulić na pruženom znanju, iskustvu i volji da pruže pomoć u bilo kojem trenutku.

Hvala mojim roditeljima što su oduvijek vjerovali u mene i podržavali me u svemu što sam željela ostvariti, te velika zahvala i mojoj tetki i kumi Marini na pruženoj pomoći u svakom trenutku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL UKUPNIH FENOLA IZOLIRANIH IZ GLOGA (*CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE*) PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Ana Ćužić 662/PI

Sažetak: Cilj rada bio je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Varirani su sljedeći uvjeti: vrijeme ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta), amplituda ultrazvuka (50 %, 75 % i 100 %) te vrsta i polarnost otapala (50 % i 70 % metanol i etanol). U ekstraktima dobivenim pri prethodno navedenim uvjetima određivani su ukupni fenoli, primjenom Folin Ciocalteu metode te antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH i FRAP metode. Prema dobivenim rezultatima, najveći ekstrakcijski prinos ukupnih fenola bio je 95,66 mgGAE g⁻¹ pri amplitudi 100 % uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola i vrijeme ekstrakcije od 6 minuta. Najveća antioksidacijska aktivnost DPPH metodom postignuta je uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola pri amplitudi 100 % u šestoj minuti ekstrakcije. Najveća antioksidacijska aktivnost FRAP metodom postignuta je uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola, pri amplitudi 50 % u šestoj minuti ekstrakcije.

Ključne riječi: cvijet i list gloga, ukupni fenoli, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 55 stranice, 13 slika, 4 tablice, 48 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničkom (PDF format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Branka Levaj

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ivona Elez Garofulić, dr. sc. Filip Dujmić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
2. Prof. dr. sc. Branka Levaj
3. Prof. dr. sc. Mladen Brnčić
4. Doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

Datum obrane: 30.09.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Technology

Laboratory for technology of fruit and vegetable preservation and processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF HAWTHORN (*CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE*) TOTAL PHENOL EXTRACT OBTAINED BY ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION

Ana Čužić, 662/PI

Abstract: The aim of this study was to optimize procedure of ultrasound assisted extraction (UAE) of phenolic compounds from the flower and leaf of hawthorn (*Crataegi folium cum flore*). The following extraction conditions were varied 3, 6 and 9 min of extraction, duration the amplitude of ultrasound (50 %, 75 % and 100 %) and the type and polarity of the solvent (50% and 70% methanol and ethanol). According to mentioned conditions in extracts, total phenols were determined by Folin Ciocalteu method, antioxidant activity by DPPH and FRAP methods was determined. According to the results, the optimal parameters for the highest yield of phenolic compounds was 95,66 mgGAE g⁻¹ at amplitude of 100 % using a 70 % aqueous methanol solution and during 6 minutes. The highest antioxidant activity determined by DPPH was achieved by use a 50 % aqueous solution of methanol at an amplitude of 100 % and the extraction time of 6 minutes. The highest antioxidant activity determined by FRAP was achieved by use a 70 % aqueous methanol, at amplitude of 50 % and extraction time of 6 minutes.

Keywords: *hawthorn leaf and flower, total phenols, ultrasound assisted extraction, antioxidant capacity*

Thesis contains: 55 pages, 13 figures, 4 tables, 48 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Phd. Branka Levaj, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Ivona Elez Garofulić, PhD. Filip Dujmić*

Reviewers:

1. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
2. PhD. Branka Levaj, Full professor
3. PhD. Mladen Brnčić, Full professor
4. PhD. Danijela Bursać Kovačević, Professor assistant

Thesis defended: 30.09.2016.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.1 Kemijski sastav gloga	4
2.2 FENOLNI SPOJEVI.....	5
2.2.1 Fenolne kiseline	5
2.2.2 Flavonoidi	6
2.2.3 Fenolni spojevi gloga	8
2.2.4 Antioksidacijsko djelovanje.....	9
2.3 METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA	10
2.4.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1 MATERIJAL	16
3.2 METODE RADA	16
3.2.1 Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta ultrazvukom.....	16
3.2.2 Određivanje ukupnih fenola primjenom spektrofotometrijske metode	20
3.2.3 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	22
3.2.4 Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	31
4.2 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM.....	36
4.3 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM.....	41
5. ZAKLJUČCI	Error! Bookmark not defined.
6. LITERATURA.....	Error! Bookmark not defined.

1. UVOD

Glog (*Crataegus spp.*), pripada porodici *Rosacea*, vrsti *Crataegus* te je poznat u tradicionalnoj medicini radi raznih pozitivnih učinaka na zdravlje kao što su liječenje srčanih problema, grčeva, krvnog tlaka i sl. Ljekovitost gloga pripisuje se brojnim bioaktivnim spojevima među kojima značajno mjesto zauzimaju polifenolni spojevi.

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti i imaju izrazito antioksidativno, antimikrobno, antivirusno i protuupalno djelovanje. Glavne polifenolne komponente kod gloga su: katehini, uglavnom (-)-epikatehin, oligomerni proantocijanidini poput B2 dimernog procijanidina i flavonoidi kao što su hiperozid (cvijeće, plod) i viteksin-2"O-ramnozid (lišće). Zbog velike različitosti u strukturi fenolnih spojeva važno je odabrati učinkovitu tehniku ekstrakcije te definirati optimalne uvjete pri kojima se dobivaju najveći prinosi fenolnih spojeva.

Uz klasične metode ekstrakcije kao što su destilacija, maceracija, perkolacija, i dr. sve se više upotrebljavaju novije metode kao što je ultrazvučna ekstrakcija. Primjena metode temelji se na mehanizmu nastajanja kavitacije djelovanjem ultrazvuka. Kavitacijski mjehurići oštećuju stanične stijenke biljnih materijala čime se olakšava ulaz otapala u materijal te povećava učinkovitost izmjene mase. Uvjeti provedbe ultrazvučne ekstrakcije značajno utječu na konačan prinos ekstrahiranih sastojaka. Kako bi postupak ekstrakcije dao što veći prinos fenolnih spojeva potrebno je optimizirati ekstrakcijske parametre: podesiti odgovarajuću frekvenciju (kHz), amplitudu (%), ciklus (%), izlaznu snagu (W) i promjer sonde (mm). Odabir postupka ekstrakcije uz sve navedeno ovisi i o fizikalno-kemijskim svojstvima određenih skupina spojeva koji se ekstrahiraju, o vrsti i polarnosti otapala, temperaturi i vremenu i temperaturi ekstrakcije (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2010; Dujmić i sur., 2013).

Stoga je cilj ovoga rada bio istražiti utjecaj vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta), amplitude ultrazvuka (50, 75 i 100 %) i polarnosti otapala (50 i 70 % vodene otopine etanola i metanola) na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva iz cvijeta i lista gloga primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Prinosi fenolnih spojeva određivani su Folin Ciocalteu metodom, antioksidacijski kapacitet određivan je DPPH i FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 GLOG (*Crataegus spp.*)

Rod *Crataegus* pripada porodici *Rosaceae* te podporodici tradicionalnog naziva *Maloideae* (Özcan i sur., 2005; Edwards i sur, 2012).

Rod *Crataegus* je porijeklom iz sjevernih umjerenih područja, uključujući dijelove sjeverne Amerike, istočne Azije, srednje Azije i Europe. Drvo gloga je rasprostranjeno u šumama nižih i toplijih područja. Glogovi rastu kao veliki grmovi ili mala stabla i uobičajeno su obavijeni trnjem. To su obično široko razgranata stabla visine od 2 do 5 metara, ali mogu doseći i 10 metara (Özcan i sur., 2005).

Grmlje ili stabla posjeduju svijetlo do tamno zeleno lišće i stvaraju guste grozdove bijelih cvjetova, često s karakterističnim mirisom trimetilamina. Plodovi su mesnate koštunice (Edwards i sur., 2012). Boja zrelih plodova varira od žute, preko zelene do crvene i tamno ljubičaste boje. Većina plodova dozrijeva od početka do sredine jeseni (Özcan i sur., 2005).

Postoji jako puno vrsta gloga i ovisno o njihovom porijeklu (Europa ili Amerika) ove biljke se koriste na različite načine; hortikulturno, kao izvor jestivih plodova (npr. mediteranski *Crataegus azarolus*, američki *C. opaca* i meksički *C. Pubescens*, u Kini *C. pinnatifida*), dok su neke druge vrste, uglavnom ograničene na medicinske upotrebe njihovih cvjetova, listova i plodova (*C. laevigata*, *C. monogyna*, široko rasprostranjeni u Europi). Ove vrste, upisane u Europskoj farmakopeji, kao i one manje korištene *C. azarolus*, *C. nigra* i *C. pentagyna* su najčešće korištene europske i sjevernoameričke vrste za fitofarmaceutske proizvode koji služe za liječenje blagih srčanih poremećaja ili nervoze (Froehlicher i sur., 2009). Ljekovitost gloga potječe od brojnih prisutnih biološki aktivnih spojeva među kojima su i fenolni spojevi. Tako su sastojci cvijeta i ploda odgovorni za sposobnost hvatanja slobodnih radikala epikatehin, hiperozid i klorogenska kiselina (Özcan i sur., 2005).

Proizvodi gloga koji se koriste u tradicionalnoj medicini često potječu od vrsta *Crataegus monogyna* i *Crataegus laevigata* (Fong, 2002). U nas se *Crataegus monogyna* naziva i bijeli glog, a navodi se i crveni glog i to pod nazivom *Crataegus oxyacantha* (Anonymus 5, 2016) iako je to stari, netočan naziv za vrstu *Crataegus laevigata* (Anonymus

6, 2016). U prirodi su rasprostranjena oba iako je rasprostranjeniji bijeli (Anonymus 4, 2016). U Hrvatskoj je još u Baranji uz Dunav prirodno rasprostranjena vrsta *Crataegus nigra*. *Crataegus monogyna* L. je polimorfna vrsta iz porodice Rosaceae, porijeklom iz sjevernih umjerenih područja (Sjeverna Amerika, Istočna Azija, Srednja Azija i Europa) (Tahirović i Bašić, 2014).

Panonski crni glog (*Crataegus nigra*) je grm ili nisko stablo do 7 m visine. Grančice su u mladosti vrlo gusto bijelo dlakave, kasnije ogole pa su crvenosmeđe do ljubičastocrvene. Lišće je trokutasto ili jajasto, prije opadanja je crveno. Plod je okruglast, promjera oko 8 mm, pri sazrijevanju je crvenkast, a kasnije crn, sjajan i sočan (Franjić i sur., 2006).

Crataegus laevigata je vrsta koja ima 2-5 m visok grm ili onisko, vrlo razgranato drvo, sa mnogo bodlji i glatkom sivom korom. Cvjeta krajem proljeća. Plod je tamnocrvena koštunica (Anonymus 1, 2016) i sastoji se od dvije koštunice (Anonymus 5, 2016).

Crataegus monogyna (bijeli glog) je grm ili nisko drvo, do 10 m visine. Grančice su gole ili malo dlakave, s trnovima dugim do 1 cm. Cvjeta od prve polovice svibnja do lipnja. Cvjeta znatno kasnije od crvenog gloga. Plod je koštunica, široko jajastog oblika, crvene boje (Anonymus 2, 2016) i sastoji se od samo jedne koštunice (Anonymus 5, 2016).



Slika 1. Crveni glog (*Crataegus laevigata*) (Anonymus 3, 2016)

2.1.1 Kemijski sastav gloga

Kod 27 različitih vrsta *Crataegus* i dva hibrida porijeklom iz Europe, Azije i Sjeverne Amerike pronađeno je 49 različitih spojeva flavonoida, 5 hidroksicimetnih kiselina, 6 šećera, 10 organskih ili fenolnih kiselina, 26 terpena i 56 spojeva eteričnih ulja.

Šećeri se proizvode u listovima te transportiraju do vakuola i slobodnog prostora ploda tijekom njegova razvoja. Šećeri koji su identificirani u plodovima vrsta *Crataegus* uključuju glukozu, saharozu, fruktozu, i ksilozu. Kvantificirani su i šećerni alkoholi, uključujući sorbitol i mioinozitol. Fruktoza je najzastupljeniji šećer u plodovima gloga, a glukoza, saharoza i ksiloza su znatno manje prisutni.

U plodovima vrsti *Crataegus* pronađene su sljedeće kiseline: jabučna, limunska, jantarna, askorbinska, vinska, kininska, protokatehinska, 3- i 4- hidroksibenzojeva i salicilna isiringinska kiselina. Limunska kiselina je najzastupljenija, nakon čega slijedi jabučna i kininska kiselina. Askorbinska, vinska i protokatehinska kiselina djeluju kao antioksidansi.

Oleanolinska kiselina i ursolična kiselina su pronađene u *C. pinnatifida*, a ursolična kiselina također je kvantitativno određena u *C. scabrifolia*. Oleanolinska i ursolična kiselina su triterpeni te stabiliziraju stanične membrane biljaka. U ljudi, oleanolinska i ursolična kiselina su pokazale da imaju anti-upalno, gastroprotektivno i hipoglikemijsko djelovanje.

Biljna eterična ulja (smjese terpenoida i fenilpropanoida) također su pronađena u ulju cvijeta gloga uključuju monoterpene, seskviterpene, norterpenoide i triterpenoide. Hlapljivi spojevi su također određeni u plodovima *C. aestivalis*, *C. opaca* i *C. rufula*, u kojima su najzastupljeniji spojevi butil butirat, butil heksanoat i heksil heksanoat.

Plodovi imaju laksativna i diuretička svojstva. Oni sadrže triterpenske kiseline, kolin, acetilkolin, trimetilamin, kafeinsku i askorbinsku kiselinu, aminokiseline, adenin i adenzin. Vitamini B1, B2, B6 i C kao i 17 aminokiselina (oko 3,1 %) utvrđeni su u plodovima gloga (Edwards i sur., 2012).

Cvjetovi sadrže eterična ulja, tanine, flavonoide, organske kiseline, acetilkolin, kolin (Anonymus 1, 2016).

Sastojci gloga imaju antioksidacijsku aktivnost za što su zaslužni fenolni spojevi. Kora gloga sadrži veću koncentraciju epikatehina i procijanidina od lista gloga, zbog toga ima jaču

antioksidacijsku aktivnost i bolje utječe na smanjenje oksidacije lipida u membrani eritrocita (Wloch i sur., 2013).

Vrste *Crataegus* u medicini se koriste za liječenje blažih oblika bolesti srca. U Europi, plodovi, lišće i cvjetovi tradicionalno su korišteni u liječenju srčanih problema, grčeva, kardiotoničkih problema, krvnog tlaka, i antiaterosklerotičnih učinaka. U Kini i Europi, plod gloga se jede, te se koristi za komercijalne proizvode kao što su vino, džem, i bomboni (Tahirović i Bašić, 2014).

Ekstrakt gloga se koristi za tretiranje rane faze kongestivnog zatajenja srca i angine pectoris. Klinički je učinkovit kod smanjenja krvnog tlaka i ukupnog kolesterola u krvi (Zhang i sur., 2001). Tradicionalno, plodovi ili bobice se koriste zbog svojih blagih svojstava kod teških menstrualnih krvarenja i proljeva, a cvjetovi i bobice djeluju kao diuretici i mogu se koristiti za liječenje problema s bubrezima i hidropsiju (Özcan i sur., 2005). Glog i njegovi pripravci poboljšavaju miokardinalne kontrakcije i provodljivost, zaštitu od ishemije (Froehlicher i sur., 2009).

2.2 FENOLNI SPOJEVI

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti široko rasprostranjeni u prirodi, sa izraženim antioksidacijskim, antimikrobnim, antivirusnim i protuupalnim djelovanjem (Kašloniene i sur., 2010; Ignat i sur., 2011).

Spojevi su aromatske strukture s više hidroksilnih supstituenata, a dijele se na flavonoide i ostale fenolne spojeve (fenolne kiseline i srodni spojevi). U prirodi su rijetko prisutni u slobodnom obliku. Nalaze se uglavnom esterificirani s malim organskim kiselinama, konjugirani sa šećernim jedinicama ili u polimernom obliku. Najveću pozornost privuklo je njihovo antioksidacijsko djelovanje i sposobnost keliranja prooksidacijskih metala poput bakra i željeza. Najviše su istraživani flavonoidi. Najveća pozornost u istraživanjima posvećena je kvercetinu–jednom od najpotentnijih i najraširenijih flavonoida (Kašloniene i sur., 2010).

2.2.1 Fenolne kiseline

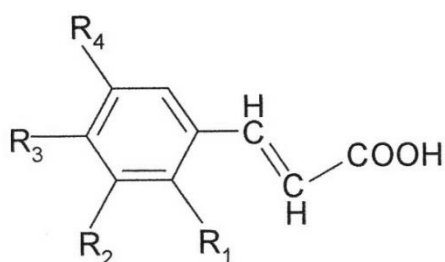
Fenolne kiseline se dijele u dvije osnovne grupe:

hidroksicimetne kiseline (C_6-C_3) (Slika 2), te

hidroksibenzojeve kiseline (C_6-C_1) i njihovi derivati.

Metilacijom i hidroksilacijom aromatskog prstena nastaju razlike u strukturi između pojedinačnih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (Macheix i sur., 1990).

U hidroksicimetne kiseline ubrajaju se kafeinska kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina), ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina), *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna kiselina) i sinapinska (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina) kiselina (Bravo, 1998).



Slika 2. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990)

U prirodi su uglavnom prisutne u različitim konjugiranim oblicima ili u obliku estera. Najpoznatiji esteri hidroksicimetnih kiselina su klorogenska kiselina (5'-kafeoilkina kiselina), neoklorogenska kiselina (3'-kafeoilkina kiselina), te izoklorogenska kiselina (4'-kafeoilkina kiselina) (Macheix i sur., 1990).

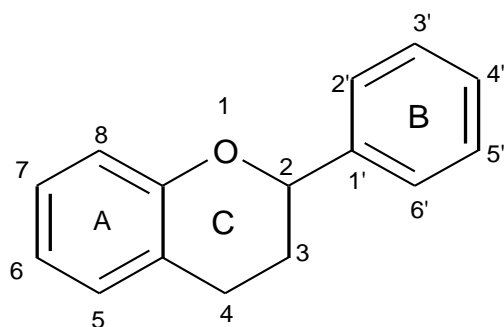
Hidroksibenzojeve kiseline nastaju direktno iz benzojeve kiseline. U njih se ubrajaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska, siringinska, elaginska te salicilna kiselina (Bravo, 1998).

Klorogenska kiselina je pronađena u plodu i listu svih istraživanih vrsta gloga, a njen izomer 5-O-kafeoil kininska kiselina (neoklorogenska kiselina) pronađena je u plodu vrste *C. grayana* (Liu i sur., 2011). Prokatehinska kiselina pronađena je u plodovima *C. pinatifida* (Zhang i sur., 2001), a kafeinska kiselina u listovima *C. laevigata* (Svedström i sur., 2002).

2.2.2 Flavonoidi

Flavonoidi su spojevi male molekulske mase, a osnovnu strukturu flavonoida (Slika 3.) čini difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil) propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena nastaje flavan od kojeg se izvodi određeni broj

osnovnih struktura (Kazazić, 2014). Tako se u flavonoide ubrajaju: flavoni (apigenin, luteolin, tangeretin), flavanoni (naringenin, hesperitin), flavanoli (katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin), flavonoli (kamferol, kvercetin, miricetin), flavanonoli (taksifolin), procijanidini (teaflavin, B1, B2, A2, C1), antocijani (delfidin, cijanidin, malvidin, petunidin, peonidin, pelargonidin), izoflavoni (daidzein, genistein), čalkoni (florelin, ksantohumol), neoflavonoidi (dalbergin) (Tsao, 2010). Neki se od njih mogu smatrati derivatima benzo- γ -pirona ili benzo- γ -pirana (Kazazić, 2014).



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (Kazazić, 2014)

Flavonoidi se u biljkama pojavljuju kao glikozidi, aglikoni i metilirani derivati. Oko 90 % flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida (Swain i sur., 1979). Flavonoidi imaju veliku sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini). U gotovo svakoj biljci pronađeni su flavonoli i u manjoj mjeri flavoni (Harborne i Baxter, 1999). Nalaze se u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Flavonoidima se pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, kao što su antibakterijska, protuupalna, antialergijska, antimutagena, antiviralna i antikancerogena (Kazazić, 2014), te povoljno utječu na mnoge bolesti, uključujući karcinogene i kardiovaskularne bolesti te neurodegenerativne poremećaje (Williams i sur., 2004).

Flavonoli su kategorija flavonoida koji se obično nalaze u mnogim vrstama voća i povrća, njihov sadržaj u velikoj mjeri se mijenja ovisno o ekološkim čimbenicima, kao što su uvjeti uzgoja, klima, skladištenje i uvjeti kuhanja. **Flavanone** karakterizira prisutnost zasićenog tri-ugljikovog lanca, a kisikov atom na položaju C4. Oni su uglavnom glikolizirani od disaharida u C7. **Izoflavoni** imaju strukturne sličnosti s estrogenima, tj hidroksilne skupine u C7 i C4, položaju, kao što su estradiol molekule. Oni su fitokemikalije koje se nalaze u mnogim biljkama i namirnicama dobivenih iz biljaka. **Antocijanini** su topljivi u vodi, biljni pigmenti koji se pojavljuju kao crveni, ljubičasti ili plavi, ovisno o pH, sintetizirani su pomoću fenilpropanoid puta. Antocijanini se pojavljuju u svim biljnim tkivima, uključujući

lišće, stabljike, korijenje, cvijeće i plodove. Antocijanini, kao i drugi fenoli, mogu djelovati kao antioksidansi donirajući vodik visoko reaktivnim radikalima, čime se sprječava daljnja formacija radikala (Ignat i sur., 2011). Kod *C. monogyna* glavni antocijan izoliran je i identificiran kao cijanidin-3-O-galaktozid (Froehlicher i sur. 2009).

2.2.3 Fenolni spojevi gloga

Procijanidini, flavanoli, flavonoli, C-glikozil flavoni, fenolne kiseline, antocijanini, lignani nalaze se u različitim dijelovima gloga. Najzastupljeniji fenolni spojevi u plodu gloga su oligomerni procijanidini i njihovi glikozidi, dok u listovima dominiraju flavonoli, flavonol glikozidi i C-glikozil flavoni (Liu i sur., 2011).

Bobice gloga sadržavaju najmanje 1 % procijanidina, dok list i cvijet sadržavaju najmanje 1,5 % flavonoida izraženo kao hiperozid. Listovi i cvjetovi sadrže flavonoide (0.1-2 %, uključujući rutin, hiperozid, viteksin, viteksin-2"-O-ramnozid i oligomerne proantocijanidine (1-3 %), fenolne kiseline (klorogenska i kafeinska kiselina), triterpenske kiseline (oleanolinska kiselina i ursolična kiselina), organske kiseline i sterole (Vijeće Europe, 2004) (Tahirović i Bašić, 2014).

Glavni flavonoidi pronađeni u vrstama *Crataegus* su flavonol-O-glikozid, (kvercetin 3-O-galaktozid) i flavon-C-glikozid, viteksin-2"-O-ramnozid i acetilviteksin-2"-O-ramnozid. Flavonol glikozidi su uglavnom koncentrirani u cvijeću, dok listovi sadrže uglavnom derivate flavona i polimere (-)-epikatehina (Edwards i sur., 2012). Viteksin i viteksin-2"-O-ramnozid su identificirani u lišću i cvijeću vrsta gloga *C. laevigata*, *C. rhipidopylla* i njihovom hibridu *C. x macrocarpa* (Ringl i sur., 2007).

Epikatehin, procijanidin dimeri B2, B4 i B5, procijanidin trimeri C1, epikatehin-(4 β →6)-epikatehin-(4 β →8)-epikatehin i epikatehin-(4 β →8)-epikatehin-(4 β →6)-epikatehin, procijanidin tetramer D1 i procijanidin pentamer E smatraju se kao glavni procijanidini u cvijetu i listu vrste *C. laevigata*, a procijanidin heksameri su također identificirani (Svedström i sur., 2002).

Tahirović i Bašić (2014) ispitivali su plodove *Crataegus monogyna* kao izvor fenolnih spojeva te su dobili sadržaj ukupnih flavonoida od 0.254 do 0.595 mg RUE g⁻¹ s.u. Sadržaj

monomernih antocijanina je iznosio od 0.004 do 0.132 mg cijanidin-3-glukozida mg g^{-1} s.u., a ukupnih proantocijanidina od 0.187 do 1.168 mg cijanidin klorida g^{-1} s.u.

Froehlicher i sur. (2009) su uspoređivali ukupne fenole u različitim dijelovima *C. monogyna*. Osušeni listovi i cvjetovi kao i cvjetni pupoljci su imali veći udio fenolnih spojeva (56 i 49 g GAEkg^{-1} suhe tvari) od sušenih plodova (12 g GAEkg^{-1} suhe tvari). Zhang i sur. (2001) kod vrste *Crateagus pinnatifida* iz frakcije etil acetata HPLC analizom dobili su da je epikatehin najrasprostranjeniji (178 mg/100 g suhih plodova), zatim klorogenska kiselina ($65 \text{ mg/100 g s. p.}$), hiperozid ($25 \text{ mg/100 g s. p.}$) izokvercitrin ($13 \text{ mg/100 g s. p.}$), protokatehinska kiselina (3 mg/100 g s. p.), rutin (3 mg/100 g s. p.) i kvercetin (1 mg/100 g s. p.).

Prinz i sur. (2007) su proveli istraživanje na vrstama *Cratageus* (*C. monogyna*, *C. pentagyna*, *C. laevigata*) te su identificirali šest flavonoida kao viteksin-2"-O-ramnozid, viteksin, izoviteksin, rutin, hiperozid i izokvercitrin. Osim glavnih spojeva izoorientina i orientina u *C. pentagyna*, sljedeća četiri flavonoida su izolirali i identificirali kao izoorientin-2"-O-ramnozid, orientin-2"-O-ramnozid, izoviteksin-2"-O-ramnozid i 8 metoksikempferol-3-O-glukozid. Spoj 8 metoksikempferol-3-O-glukozid je izoliran po prvi put iz *C. pentagyna*. U uzorcima *C. monogyna* prevladavaju 4" '-acetilviteksin-2"-O-ramnozid, kojeg nije bilo u *C. pentagyna*. Dakle, ovaj je spoj zanimljiv za kemotaksonomiju *C. monogyna*. A neprisutnost spojeva izoorientina, orientina, 8-metoksikaempferol-3-O-glukozida i 4" '-acetilviteksin-2"-O-ramnozida u *C. laevigata* može pomoći za dodatno razlikovanje od *C. monogyna* i *C. pentagyna*.

2.2.4 Antioksidacijsko djelovanje

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprečavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, a u biološkim sustavima onemogućavaju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa) kad su oni u štetnom suvišku odnosno kad je koncentracija slobodnih radikala veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa.) Osim što sprječavaju neželjene procese oksidacije, antioksidansi mogu doprinijeti smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala (Halliwell, 1990). Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva je bitna zbog redoks svojstava i mogu imati bitnu ulogu u apsorpciji i neutralizaciji slobodnih radikala (Osawa, 1994).

Aglikoni su snažniji antioksidansi od odgovarajućih glikozida. Usporedba luteolina s njegovim 4'-mono (TEAC-vrijednost 1,7 mmol dm⁻³) i 3',7-diglukozidom (TEAC-vrijednost 0,8 mmol dm⁻³) pokazuje da se antioksidacijska svojstva flavonskih glikozida smanjuju s porastom broja glikozidnih skupina. Osim same prisutnosti i ukupnog broja glikozidnih skupina važnu ulogu ima i položaj u kojem se nalazi pojedina skupina, kao i struktura šećera (Kazazić, 2014).

U istraživanju Garcia-Mateos i sur. (2013) na uzorcima plodova gloga koji su prikupljeni na području Meksika, uzorci su obuhvatili ukupno 20 genotipova gloga. Nije pronađena nikakva veza između antioksidacijskog djelovanja u odnosu na sadržaj flavonoida (negativna korelacija).

Osam spojeva koji su izdvojeni iz frakcije etil acetata u plodovima vrste *Crataegus* pokazali su različito antioksidacijsko djelovanje. Ursolična kiselina nije pokazala antioksidacijsko djelovanje, dok je hiperozid imao najveću vrijednost nakon čega slijedi kvercetin i izokvercitrin. Pod istim eksperimentalnim uvjetima, antioksidacijska aktivnost epikatehina, klorogenske kiseline i rutina bila je slična, ali je mnogo slabija nego što ima hiperozid, kvercetin te isokvercitrin (Zhang i sur., 2001).

2.3 METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija se može definirati kao izdvajanje neke tvari iz otopine, suspenzije ili čvrste tvari pomoću otapala, tj. radi se o prijenosu tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo (Albu i sur., 2004).

Uz klasične metode ekstrakcije kao što su destilacija, maceracija, perkolacija, i dr. sve se više upotrebljavaju novije metode kao što su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidom.

Ekstrakcija je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcijom dobivamo tvar za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno dobivenu otopinu upariti ili kristalizirati.

Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su:

1. Destilacija: direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom;
2. Ekstrakcija otapalima: ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima;
3. Hladno prešanje;
4. Nekonvencionalne tehnike: ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo – ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

Općenito za ekstrakciju vrijedi sljedeće:

Pri ekstrakciji čvrstih tvari treba povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama (usitnjavanjem), u sredini treba povećati brzinu gibanja faza, za povećanje količine tvari, treba produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije. Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze može se izvoditi pri sobnoj temperaturi (maceriranje, perkoliranje) i pri povišenoj temperaturi. Ekstrakcija pri povišenoj temperaturi može se izvesti zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom. Druga metoda ekstrakcije pri povišenoj temperaturi je kontinuirana i višekratna i izvodi se u Soxhlet aparatu. Ekstrakcija se može odvijati kao kontinuirana i diskontinuirana, jednostepena, višestepena, višestepena protustrujna, ekstrakcija unakrsnim stupanjem s jednim otapalom.

Upotreba ultrazvuka rezultira značajnim poboljšanjem ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim tehnikama kao što su Soxhlet ekstrakcija zbog manje upotrebe otapala, kraćeg vremena tretmana (Blekić i sur., 2011). Klasične metode ekstrakcije pokazuju nisku učinkovitost i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala te dugotrajnosti koje ove metode zahtijevaju. Stoga se sve više ispituju nove metode ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. microwave-assisted extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. ultrasonic-assisted extractions, UAE) te ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (eng. pressurized liquid extraction, PLE).

2.4.1 Izbor otapala u ekstrakciji

Za ekstrakciju je vrlo važan izbor otapala, ono ovisi o vrsti i svojstvima tvari koju želimo izolirati. Prilikom odabira otapala vrlo je bitno uzeti u obzir: polarnost otapala, točku ključanja (poželjno je da bude što niža da se olakša odvajanje otapala od komponente), reaktivnost (otapalo ne smije reagirati s ekstraktom), viskozitet (poželjno je da otapalo ima što

nižu viskoznost), ekstrakcijski kapacitet otapala, selektivnost, stabilnost otapala na temperaturu, kisik i svjetlo, otapalo ne smije biti škodljivo za ljude niti za okoliš (Albu i sur., 2004).

Najčešće korištena otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva su vodene otopine etanola, metanola i acetona (Sun i Ho, 2005). Među alkoholima, etanol daje najbolji prinos fenolnih spojeva, metanol nešto manji, a izopropanol najmanji (Lapornik i sur., 2005).

Aceton i alkoholna otapala najčešće se koristi za ekstrakciju antioksidacijskih fenola (antocijana, flavonoida i njihovih glikozida, tanina, itd.) iz raznih biljnih izvora. Općenito, oni daju vrlo visok prinos ukupnih ekstrakata iako nisu visoko selektivni za fenole. Osobito su se pokazale učinkovitim smjese voda-alkoholi u ekstrakciji fenolnih spojeva u odnosu na odgovarajuće jednokomponentne sustave otapala (d'Alessandro i sur., 2012).

Tahirović i Bašić (2014) proveli su istraživanje na *C. monogyna*, ispitujući sadržaj fenola i antioksidacijsku aktivnost, koristeći različita otapala: 100 % etanol i metanol, 80 % etanol i metanol, 50 % metanol i etanol i vodu. Najviši prinos fenola nađen je u ekstraktima s 80 % metanolom, zatim kod 50 % metanola (4,185 mgGAE g⁻¹), a najniža količina fenola je bila u ekstraktima s 100 % etanolom (2,010 mgGAE g⁻¹) te zatim u ekstraktima s vodom (2,02 mgGAE g⁻¹). Ekstrakti s metanolom sadržavaju veću količinu ukupnih fenola u odnosu na ekstrakate s etanolom koji mogu biti uzrokovane većom polarnosti otapala. Također, smjese alkohol/voda pokazuju bolju učinkovitost u ekstrakciji od čistog alkohola.

2.4.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz. Budući da ljudsko uho može čuti zvukove čija je frekvencija u rasponu od 16 Hz do 16 kHz, frekvencija ultrazvuka previsoka je za ljudsko slušno područje (Herceg i sur., 2009). U prehrambenoj industriji primjenjuju se ultrazvučni valovi dvaju područja frekvencija. To su UZ valovi niskih intenziteta (manje od 1 W cm⁻²) frekvencija 5 do 10 MHz, te UZ valovi visokog intenziteta (10 do 1 000 W cm⁻²) i frekvencija od 16 kHz-100 kHz (ultrazvuk visoke snage) i od 100 kHz-2 MHz (prijelazno područje). Za primjenu u prehrambenoj industriji najpovoljnije frekvencije ultrazvuka su one više od 20 kHz.

Ultrazvuk niskih snaga je ultrazvuk intenziteta manjih od 1 W cm^{-2} i frekvencije više od 2 MHz. Uspješno se primjenjuju za neinvazivnu detekciju (kontrolu operacije) i za karakterizaciju fizikalno-kemijskih značajki materijala (procjenu proizvoda i kontrolu), Određivanje brzine kapljevina u cjevovodima, određivanje visine stupca kapljevine u spremnicima te određivanje nepoželjnih stranih tijela (Režek Jambrak i sur. 2010).

Ultrazvučni valovi niskog intenziteta ne izazivaju fizička oštećenja materijala, i mogu se koristiti u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane (Lelas, 2006).

Ultrazvuk visoke snage znači primjenu intenziteta višeg od 1 W cm^{-2} (uobičajeno u rasponu od $10\text{--}1000 \text{ Wcm}^{-2}$) i frekvencija između 18 i 100 kHz. Ultrazvuk veće snage niskih frekvencija (20 do 100 kHz) smatra se “snažnim ultrazvukom” jer uzrokuje kavitaciju te ima primjenu u prehrambenoj industriji. Primjenjuje se za odzračivanje tekuće hrane, za induciranje reakcija oksidacije/redukcije, za ekstrakciju enzima i proteina, za inaktivaciju enzima i za indukciju nukleacije kod kristalizacije. Nadalje, druga ispitivanja pokazala su da ultrazvuk pospješuje prijenos topline. Primjenjuje se za emulgiranje, sterilizaciju, ekstrakciju, odzračivanje, filtriranje, sušenje i pojačavanje oksidacija. Ultrazvuk visokog intenziteta generiran periodičnim mehaničkim gibanjima sonde, prenosi ultrazvučnu energiju u tekući medij i uzrokuje vrlo velike promjene u tlaku, koje dovode do stvaranja malih vrlo brzo rastućih mjehurića. Mjehurići se šire tijekom negativnog tlaka te implodiraju tijekom pozitivnog tlaka stvarajući visoke temperature, tlakove i sile na vrhu sonde. Ultrazvuk visokog intenziteta potiče ekstrakciju proteina povećavajući topljivost, ali i vodi do smanjenja molekulske mase proteina (Režek Jambrak i sur. 2010).

Najraširenija upotreba ultrazvuka je vjerojatno u procesima ekstrakcije različitih organskih komponenti iz biljnih sirovina. Primjena metode sastoji se u tome što ultrazvučni valovi oštećuju stanične stijenke biljnih materijala čime se olakšava ulaz otapala u materijal te povećava efikasnost izmjene mase (Lelas, 2006.)

Tijekom obrade materijala ultrazvukom visokog intenziteta, kada zvučni val dođe do tekuće sredine, nastaju longitudinalni valovi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa sažimanja i ekspanzije. Ovo naizmjenično izmjenjivanje tlaka izaziva kavitacije pri čemu se formiraju mjehurići plina u materijalu. Ovi mjehurići imaju veću površinu tijekom ekspanzijskog ciklusa što povećava difuziju plina uzrokujući ekspanziju mjehurića. Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinska faza, u mjehuriću dolazi do brze

kondenzacije. Ove kondenzirane molekule sudaraju se velikom brzinom pri čemu nastaju šok valovi. Ovi šok valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa).

Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, intenzitetu), svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) i okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) (Brnčić i sur., 2009).

Važan dio ekstrakcije potpomognute ultrazvukom je optimizacija procesa. Frekvencija (kHz), amplituda (%), ciklus (%), nazivna izlazna energija (W), i geometrijski parametri sonde (dužina i promjer – mm) moraju biti pravilno odabrani i uzeti u obzir (Herceg i sur., 2009; Brnčić i sur., 2010; Dujmić i sur., 2013).

Ultrazvučna ekstrakcija može biti:

- Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji
- Ekstrakcija sa uronjenom sondom

Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno su jeftine.

Mehaničko djelovanje ultrazvuka osigurava više dobrobiti koje poboljšavaju ekstrakciju klasičnim putem:

- Bolji prolazak otapala u stanicu;
- Poboljšan prijenos mase;
- Razbijanje stijenci stanica u biljnom materijalu što omogućuje lakše otpuštanje staničnih sastojaka (Brnčić i sur. 2009).

Tahirović i Bašić (2014) su istraživali utjecaj ekstrakcije na udio polifenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost *C. monogyne*. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta. Svi ispitivani ekstrakti su pokazali antioksidacijsko djelovanje, ali ekstrakti ekstrahirani sa metanolom i etanolom imali su jaču antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ekstraktom vode. Provedeno istraživanje pokazalo je da su ekstrakti *C. monogyna* bogat izvor polifenola i proantocijanidina. Najbolji rezultati u pogledu najzastupljenijih bioaktivnih spojeva dobiveni su s 80 % metanolom. Istražena je korelacija između pojedinih vrsta bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog djelovanja. Dobiveni rezultati su pokazali da postoji veća povezanost između sadržaj ukupnih fenola i sadržaj ukupnih proantocijanidina, a manja korelacija sa sadržajem ukupnim flavonoida i monomernih antocijana.

Šić Žlabur i sur. (2015) proveli su istraživanje na listovima biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni, uspoređivali su UAE i konvencionalne metode ekstrakcije. Kao otapala korišteni su voda i 70 % etanol. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom rezultirala je većim prinosima steviol glikozida i ukupnih fenolnih spojeva i flavonoida u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije, te je skraćeno i samo vrijeme ekstrakcije. Optimalni uvjeti ekstrakcije su vrijeme ekstrakcije od 10 minuta, promjer sonde 22 mm i temperatura 81.2 °C. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata je u korelaciji sa ukupnom količinom fenola. Rezultati prinosa ukupnih fenola veći su sa sondom promjera 22 mm (77,89 mg/g uzorka), nego sa sondom promjera 7 mm (59,43 mg/g uzorka).

Albu i sur. (2004) su istraživali utjecaj različitih otapala i utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju karnozinske kiseline iz ružmarina. Provedenom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom primjenom etanola kao otapala je ekstrahirana gotovo jednaka količina aktivnih spojeva u odnosu na klasični postupak ekstrakcije gdje su bolji rezultati postignuti primjenom etil acetata i butanona. Temeljem toga može se zaključiti da primjena ultrazvuka u postupku ekstrakcije može omogućiti primjenu sigurnijih, zdravstvenih i ekoloških prihvatljivijih otapala.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJAL

Istraživanje je provedeno na biljnoj mješavini cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) nabavljenoj u suradnji sa Suban d.o.o. (biljna mješavina je sakupljena na području RH te osušena). Biljna mješavina cvijeta i lista gloga je samljevena pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevit CG1, Italy) u fini prah.

3.2 METODE RADA

3.2.1 Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljne mješavine cvijeta i lista gloga primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom provedena je prema planu eksperimenta (Tablica 1.). Ispitivani su utjecaji sljedećih parametara: vrsta otapala, polarnost otapala, vrijeme trajanja ekstrakcije i amplituda ultrazvuka.

Tijekom istraživanja, na dobivenim ekstraktima gloga provedene su sljedeće spektrofotometrijske analize:

Određivanje ukupnih fenola

Antioksidacijski kapacitet DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet FRAP metodom

Tablica 1. Eksperimentalni dizajn ekstrakcije fenolnih spojeva iz mješavine cvijeta i lista gloga primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

	Otapalo	Amplituda (%)	Polarnost (%)	Vrijeme (min)
1	Etanol	50	50	3
2	Etanol	50	50	6
3	Etanol	50	50	9
4	Etanol	50	70	3
5	Etanol	50	70	6
6	Etanol	50	70	9
7	Etanol	75	50	3
8	Etanol	75	50	6
9	Etanol	75	50	9
10	Etanol	75	70	3
11	Etanol	75	70	6
12	Etanol	75	70	9
13	Etanol	100	50	3
14	Etanol	100	50	6
15	Etanol	100	50	9
16	Etanol	100	70	3
17	Etanol	100	70	6
18	Etanol	100	70	9
19	Metanol	50	50	3
20	Metanol	50	50	6
21	Metanol	50	50	9
22	Metanol	50	70	3
23	Metanol	50	70	6
24	Metanol	50	70	9
25	Metanol	75	50	3
26	Metanol	75	50	6
27	Metanol	75	50	9
28	Metanol	75	70	3
29	Metanol	75	70	6
30	Metanol	75	70	9
31	Metanol	100	50	3
32	Metanol	100	50	6
33	Metanol	100	50	9
34	Metanol	100	70	3
35	Metanol	100	70	6
36	Metanol	100	70	9

Aparatura i pribor:

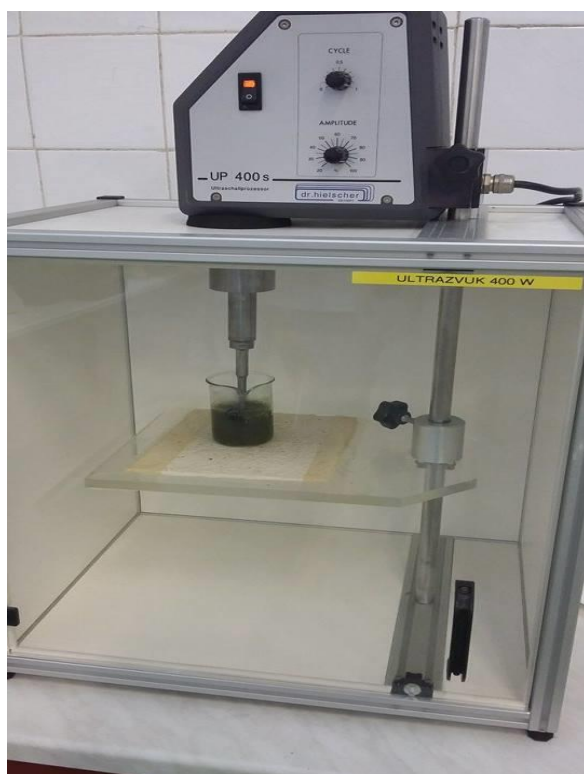
1. Analitička vaga (METTLER)
2. Ultrazvučni procesor UP 400 S, promjer sonde 7 mm, Hielscher, Njemačka
3. Zaštitne naočale
4. Zaštitne slušalice
5. Centrifuga (HETTICH, Rotofix 32)
6. Kivete (50mL)
7. Staklene čaše (100mL)
8. Menzure, volumena 100mL i 1L
9. Stakleni štapić
10. Pipete (20 i 25 mL)
11. Odmjerne tikvice volumena 50 mL
12. Erlenmeyer-ove tikvice volumena 50 mL
13. Stalak za epruvete
14. Epruvete

Kemikalije i otapala:

- Etanol, 96 %-tni
- Etanol, 50 %-tni
- Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 520,8 mL 96 %-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Etanol, 70 %-tni
- Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 729,1 mL 96 %-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Metanol, 100%-tni
- Metanol, 50 %-tni
- Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 500 mL 100 %-tnog metanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Metanol, 70 %-tni
- Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 700 mL 100 %-tnog metanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.

Postupak ekstrakcije:

Izvaže se 1 g ($\pm 0,001$ g) uzorka samljevenog cvijeta i lista gloga, prebaci u staklene čaše volumena 100 mL, te se menzurom doda 50 mL otapala za ekstrakciju. Potom slijedi ekstrakcija ultrazvuka pri zadanim parametrima ekstrakcije. Smjese otapala i uzorka su izložene djelovanju ultrazvuka kroz 3, 6, i 9 minuta pri amplitudi ultrazvuka 50, 75 i 100 % te je provedena ekstrakcija na uređaju s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom. Za provedbu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom korišten je ultrazvuk jakosti 400 W, sonda Dr. Hielscher UP 400s promjera 7 mm, te ciklus 1. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti se kvantitativno pomoću staklenog lijevka prenesu u odmjerne tikvice volumena 50 mL, te nadopune otapalom za ekstrakciju do oznake. Potom se uzorci prebace u plastične kivete volumena 50 mL i centrifugiraju u centrifugi (HETTICH, EBA 3S, Tuttlingen, Njemačka) na 5500 rpm/10 minuta. Ekstrakti se potom dekantiraju u druge kivete i skladište na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjih analiza. Sve ekstrakcije su provedene u paraleli.



Slika 5. Ekstrakcija s uronjenom sondom (Vlastita fotografija, 2016)

3.2.2 Određivanje ukupnih fenola primjenom spektrofotometrijske metode

Princip:

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm.

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
7. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
8. Staklene epruvete
9. Plastična lađica za vaganje
10. Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
11. Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)

Kemikalije i reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

3. Standard galne kiseline

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Razrjeđenja:

Ekstrakti gloga dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom prije analize razrijeđeni su 10 puta s otapalom koje je korišteno za ekstrakciju.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL razrijeđenog ekstrakta 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

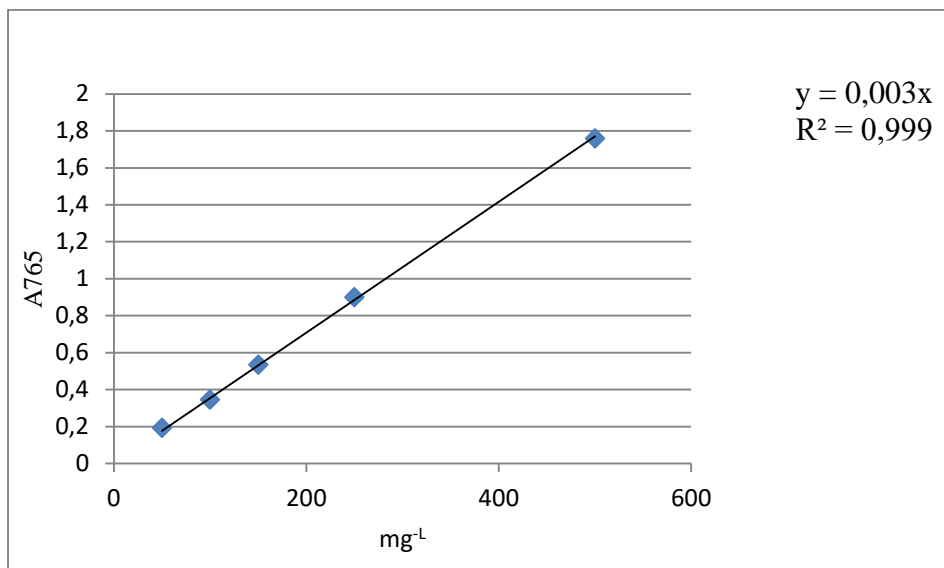
Izračunavanje

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 $\text{mg}^{-\text{L}}$. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline ($\text{mg}^{-\text{L}}$), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 6. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline ($\text{mg}^{-\text{L}}$)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline ($\text{mg}^{-\text{L}}$)

$$X (\text{mgg}^{-1}) = X(\text{mg}^{-\text{L}}) \times V(\text{L}) \times \text{razrjeđenje} / m(\text{g})$$

Maseni udjeli fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline mgGAE/g .

3.2.3 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip:

Ova metoda razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani uporabom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala

s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Braca i sur., 2001; Prior i sur., 2005).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
6. Epruvete
7. Stalak za epruvete
8. Plastična ladica za vaganje

Kemikalije i reagensi:

1. 100 %-tni metanol
2. 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,02 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala se odvažuje u plastičnoj ladici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100 %-tnom metanolu te nadopuni do oznake 100 %-tnim metanolom u odmjernoj tkvici od 100 mL. DPPH je potrebno čuvati na tamnom mjestu u zatvorenoj tikvici.

- a) Standard Trolox (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (0,02 M)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu troloxa u koncentraciji 0,02 mol/L. 500 mg troloxa se odvažuje u plastičnoj ladici za vaganje te kvantitativno prenese i otopi u 100%-tnom metanolu i nadopuni do oznake metanolom u odmjernoj tkvici od 100 mL. Otopinu troloxa potrebno je čuvati na tamnom (tikvica se zamota u aluminijsku foliju) i koristi se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

Razrijeđenja:

Ekstrakti gloga dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom prije analize razrijeđeni su 50 puta, 65 puta, 100 puta s otapalom koje je korišteno za ekstrakciju. Za određivanje

antioksidacijske aktivnosti gloga dobivenog pomoću UAE korištena je 0,2 mM otopina DPPH.

Postupak određivanja:

Postupak određivanja provodi se prema metodi za određivanje AA u ekstraktima gloga (Shortle i sur., 2014). U epruvetu se otpipetira 0,75 mL razrijeđenog ekstrakta te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 % metanola.

Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanca pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Izračunavanje:

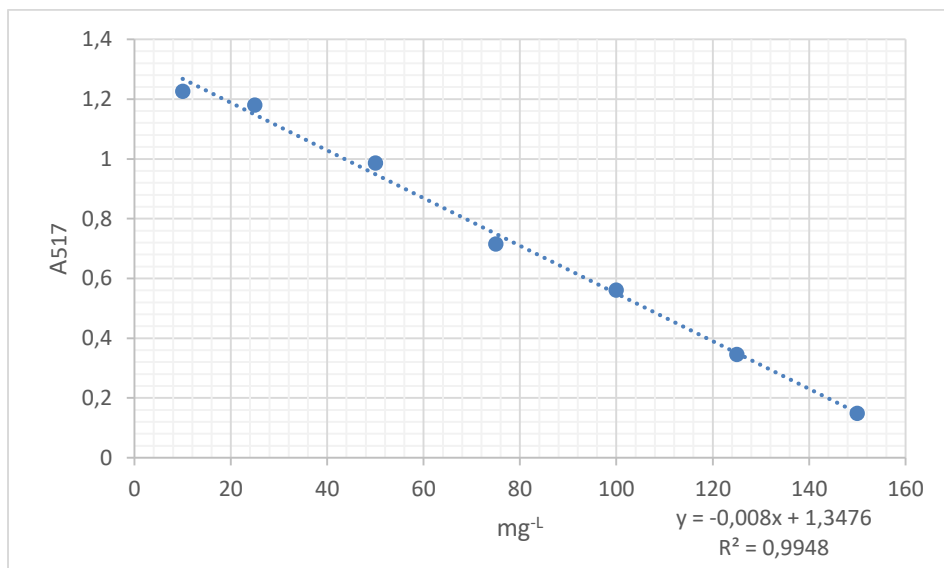
Izrada baždarnog pravca Trolox (0,2 mM DPPH):

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) tako da se odvaži 0,025 g Troloxa. Odvaga se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjerne tikvici od 100 mL.

Od 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μ M.

U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100% metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbanca pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Ukoliko su izmjerene apsorbanice manje od 0,1 ekstrakte uzoraka je potrebno razrijediti na način da se izmjerene apsorbanice u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.



Slika 7. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa (mg^{-L})

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,008 x + 1,3476$$

$$R^2 = 0,9948$$

gdje je:

Y = apsorbancija uzorka pri 517 nm

X = ekvivalent troloxa (TAE) (mg^{-L})

R² - koeficijent determinacije

$$X \text{ (mgg}^{-1}\text{)} = X \text{ (mg}^{-L}\text{)} \times V \text{ (L)} \times \text{razrjeđenje/m(g)}$$

Maseni udjeli fenola izraženi su kao ekvivalent Troloxa mgAAE/g.

3.2.4 Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip:

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77V. Svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju

redukcije željeza te tako doprinjeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Reakcija prijenosa elektrona odvija se relativno brzo, najčešće u trajanju od 4 do 6 minuta, pa se njome može opisati antioksidacijski kapacitet onih fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju veoma brzo, dok za one spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja, ova metoda nije izrazito prikladna.

FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO_4 , askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01\text{g}$)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Mikropipete, volumena $100\ \mu\text{L}$ i $1000\ \mu\text{L}$
6. Staklene epruvete
7. Pipete, volumena $1\ \text{mL}$, $2\ \text{mL}$, $5\ \text{mL}$, $10\ \text{mL}$ i $25\ \text{mL}$
8. Odmjerne tikvice, volumena $10\ \text{mL}$, $100\ \text{mL}$, $500\ \text{mL}$ i $1\ \text{L}$
9. Vortex MS2 Minishaker IKA
10. Plastična lađica za vaganje
11. Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
12. Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)

Kemikalije i reagensi:

1. Klorovodična kiselina, 37 %-tna
2. Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se $330\ \mu\text{L}$ 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od $100\ \text{mL}$.

3. TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

4. Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina

Priprema: Odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

5. Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna

6. Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

7. FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

8. Standard askorbinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L. Odvaži se 0,100 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Napomena: Prije početka rada sve reagense (uključujući i standarde) potrebno je inkubirati na 37 °C 10 minuta.

Razrijeđenja:

Ekstrakti gloga dobiveni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom razrijeđeni su 100 puta otapalom koje se koristilo za ekstrakciju. Ukoliko izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakta uzoraka je potrebno razrijediti na način da se izmjerene apsorbancije u razrijeđenim ekstraktima iznose od 0,1 do 0,9.

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μL ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbanacija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran.

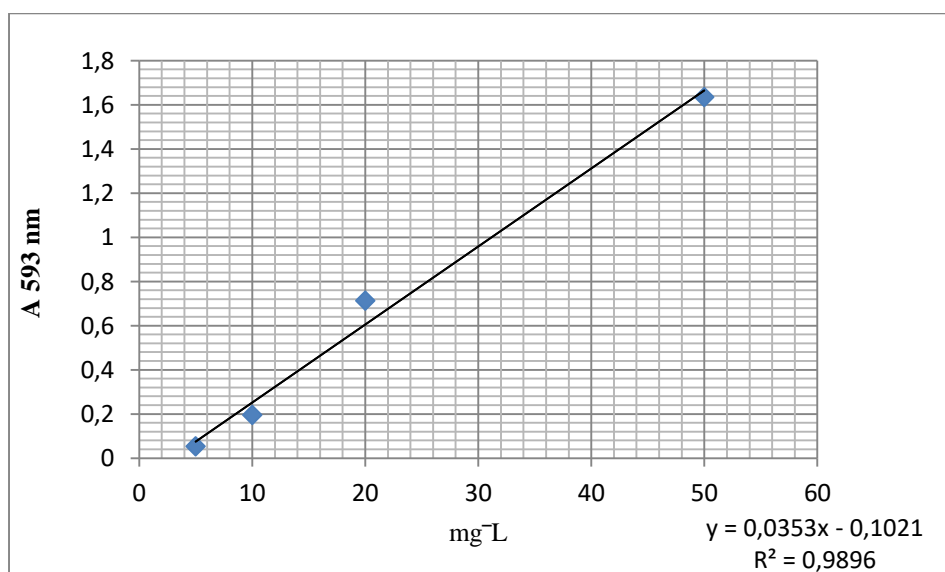
Izračunavanje:

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L od koje se pripremaju razrjeđenja u koncentracijama: 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 0,5, 1, 2, 1 i 5 mL alikvot otopine askorbinske kiseline te do oznake nadopuni destiliranom vodom.

U staklene epruvete redom se otpipetira 300 μL otopine standarda i 2250 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te 10 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (vodena kupelj od rotavapora). Zatim se mjeri apsorbanacija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje destilirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije nacrtana se baždarni pravac pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline ($\text{mg}^{-\text{L}}$) na apscisi i vrijednostima apsorbanacije nanesenim na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet uzoraka određen FRAP metodom.



Slika 8. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 593 nm o koncentraciji askorbinske kiseline ($\text{mg}^{-\text{L}}$)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0353X - 0,1021$$

$$R^2 = 0,9896$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 593 nm

X = ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) ($\text{mg}^{-\text{L}}$)

R^2 - koeficijent determinacije

$$X (\text{mgg}^{-1}) = X(\text{mg}^{-\text{L}}) \times V(\text{L}) \times \text{razrjeđenje}/m(\text{g})$$

Maseni udjeli fenola izraženi su kao ekvivalent askorbinske kiseline mgAAE/g .

Obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) je potrebno pomnožiti s 2.

$$\text{FRAP} = \text{Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE)} \times 2$$

4.REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost uzorka lista i cvijeta gloga. Ekstrakcija navedenih skupina provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) pri zadanim uvjetima kako je opisano u poglavlju 3.2 METODE.

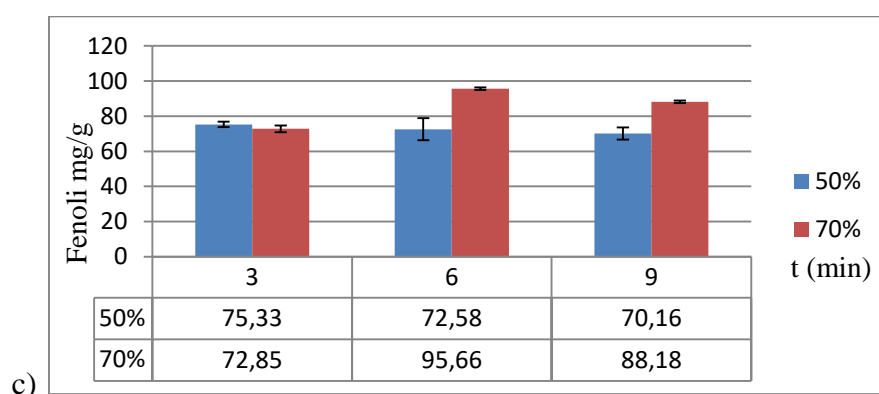
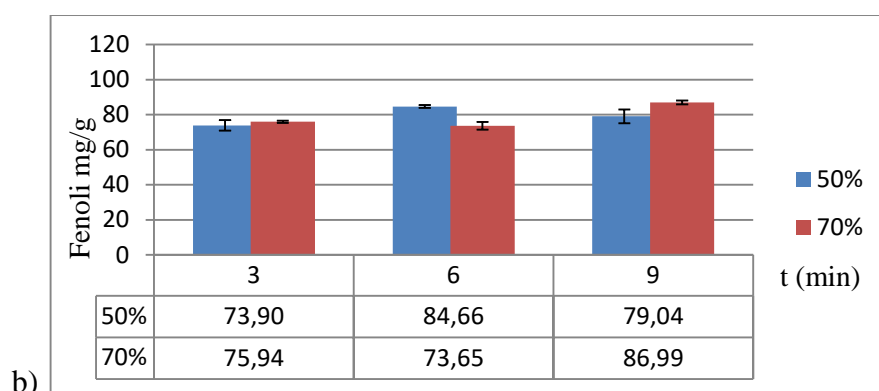
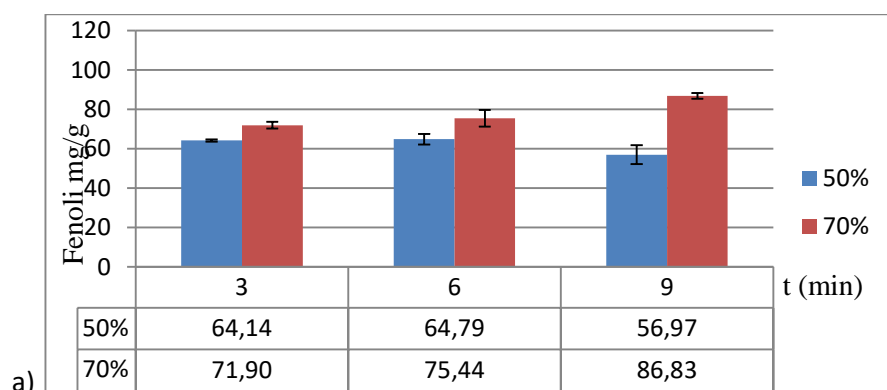
Na slikama 9. i 10. prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta i lista glog (mg/g) primjenom UAE, pri amplitudi od 50, 75 i 100 % te uz primjenu vodenih otopina metanola i etanola (50 i 70 %), kroz vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta.

Na slikama 11. i 12. prikazana je antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom iz cvijeta i lista gloga (mg/g) primjenom UAE, pri amplitudama 50, 75 i 100 % uz primjenu vodenih otopina metanola i etanola (50 i 70 %), kroz vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta.

Na slikama 13. i 14. prikazana je antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iz cvijeta i lista gloga (mg/g) primjenom UAE, pri amplitudama 50, 75 i 100 % uz primjenu vodenih otopina metanola i etanola (50 i 70 %), kroz vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta.

Eksperimentalno dobiveni podaci te njihova ovisnost o udjelu etanola/metanola u otapalu za ekstrakciju, vremenu trajanja ekstrakcije, te temperaturi ekstrakcije i amplitudi ultrazvuka, obrađeni su pomoću MS Excel programskog paketa.

4.1 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA



Slika 9. Maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgGAE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz primjenu 50 % i 70 % vodenih otopina etanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta.

a)uz amplitudu 50 %

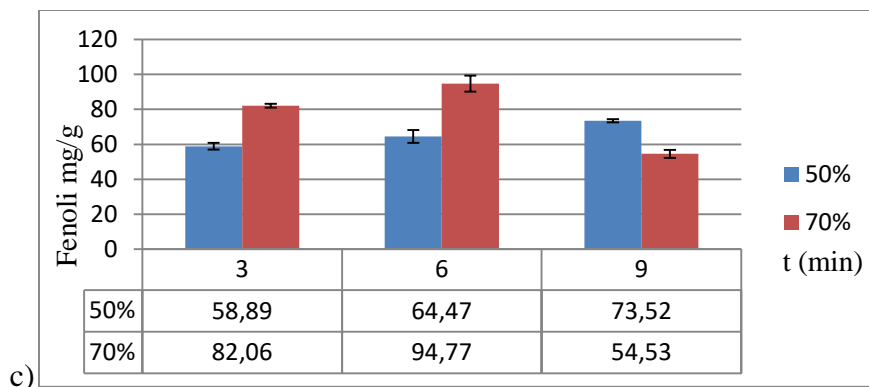
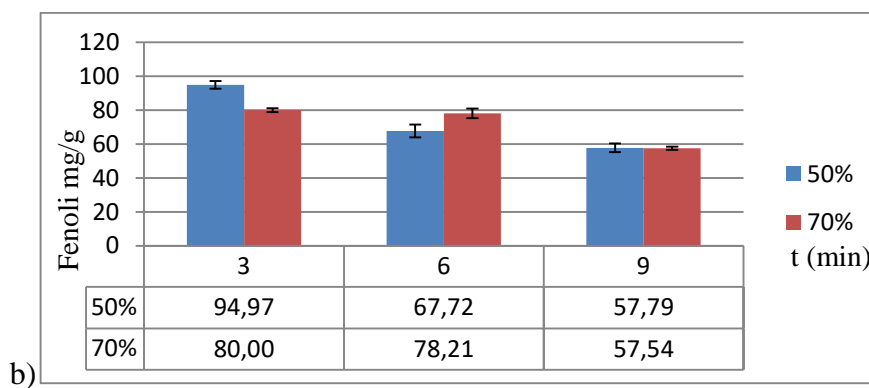
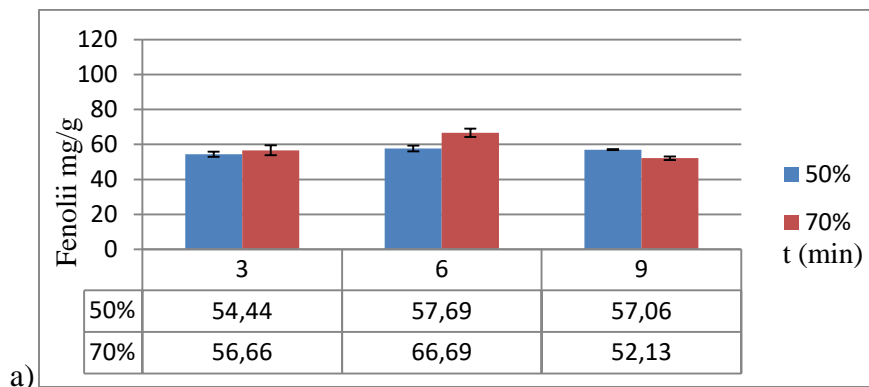
b)uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

Primjenom vodenih otopina etanola (50 i 70 %) kroz vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta, pri amplitudama 50, 75 i 100 % na slici 9. prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) (mgGAE g⁻¹) primjenom UAE.

- a) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 50 % najveći prinos fenola dobiven je uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola. Tijekom 9 minuta ekstrakcije ostvaren je najveći prinos fenola 86,83 mgGAE g⁻¹. Uz primjenu ekstrakcijskog otapala s manjim udjelom etanola (50 %), dobiveni prinosi su manji, vrijeme ekstrakcije je utjecalo neznatno na povećanje prinosa, kako se vrijeme ekstrakcije povećavalo tako su i prinosi ekstrakcije bili neznatno veći.
- b) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 75 % najveći prinos fenola dobiven je uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola. Tijekom 9 minuta ekstrakcije ostvaren je najveći prinos fenola 86,99 mgGAE g⁻¹. Uz primjenu ekstrakcijskog otapala s manjim udjelom otapala (50 %), dobiveni prinosi su manji, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na prinose ekstrakcije, prinosi ekstrakcije su bili podjednaki.
- c) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 100 % najveći prinos fenola dobiven je uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola. Tijekom 6 minuta ekstrakcije ostvaren je najveći prinos fenola 95,66 mgGAE g⁻¹. Uz primjenu ekstrakcijskog otapala s manjim udjelom otapala (50 %), dobiveni prinosi su manji, vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na prinose ekstrakcije, tj. s povećanjem vremena ekstrakcije, prinosi su se smanjivali odnosno prinosi ekstrakcije su podjednaki.

Pri amplitudi 100 % ostvaren je najveći prinos fenola uz 70 % vodenu otopinu etanola (95,66 mgGAE g⁻¹). Povećanjem amplitude ne dolazi do neke velike razlike kod prinosa ekstrakcije, te vrijeme nije značajno utjecalo na prinose ekstrakcije.



Slika 10. Maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (mgGAE g^{-1}) dobiveni primjenom UAE uz primjenu 50 % i 70 % vodenih otopina metanola, kroz vrijeme od 3, 6 i 9 minuta.

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

Primjenom vodenih otopina metanola (50 i 70 %) kroz vrijeme ekstrakcije od 3, 6 i 9 minuta, pri amplitudama 50, 75 i 100 % na slici 10. prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola ekstrahiranih iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) (mgGAE g⁻¹) primjenom UAE.

- a) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 50 % najveći prinos fenola dobiven je uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola. Tijekom 6 minuta ekstrakcije ostvaren je najveći prinos 66,69 mgGAE g⁻¹. Vrijeme ekstrakcije nije bitno utjecalo na prinose ekstrakcije, a pri upotrebi 50 % metanola dobiveni su manji prinosi.
- b) U ekstraktima dobivenim pri amplitudi 75 % najveći prinos fenola dobiven je uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u vremenu trajanja 3 minute ekstrakcije (94,97 mgGAE g⁻¹). Povećanjem vremena ekstrakcije i uz upotrebu 70 % metanola dobiveni prinosi ekstrakcije su manji.
- c) Najveći prinosi fenola pri amplitudi 100 % dobiven je uz upotrebu 70 % metanola u vremenu trajanja 6 minuta ekstrakcije (94,77 mgGAE g⁻¹). Prinosi fenola dobiveni s 50 % metanolom su manji te vrijeme je različito utjecalo na prinose ekstrakcije ovisno o udjelu alkohola.

Općenito, pri amplitudi 75 % i 3 minuti ekstrakcije ostvaren je najveći prinos fenola uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola (94,97 mgGAE g⁻¹). Daljnje povećanje amplitude i vremena različito su utjecali na prinos fenola ovisno o drugim uvjetima ekstrakcije. Tako je gotovo ista vrijednost postignuta i pri amplitudi 100 % i 6 minuta uz upotrebu 70 % metanola.

Uspoređujući oba otapala; metanol i etanol (50 % i 70 % vodene otopine) koje smo koristili za ekstrakciju, kao bolje otapalo pokazao se etanol i to 70 % vodena otopina, tako su dobiveni veći prinosi fenola (95,66 mgGAE g⁻¹). Vrijeme nije imalo jasan utjecaj na prinose fenola, te povećanje vremena ekstrakcije ne znači i povećanje prinosa fenola, jer najveći prinosi fenola dobiveni su u šestoj minutiekstrakcije. Kod etanola bolje su se pokazale 70 % vodene otopine u odnosu na 50 % otopinu.

Muniz-Marquez i sur. (2013) su proveli istraživanje na biljci *Laurus nobilis* L. koristeći ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom radi dobivanja fenolnih spojeva. Najveći prinos fenolnih spojeva 17.32 ± 1.52 mg g⁻¹ postignut je uz sljedeće uvjete ekstrakcije: 1 g uzorka biljke je tretiran s 12 ml 35 % etanola tijekom 40 minuta.

Paniwnyk i sur. (2009) su istraživali utjecaj različitih metoda ekstrakcije na izolaciju karnozinske kiseline iz ružmarina te su najbolji učinak postigli primjenom etanola u odnosu na metanol primjenom uređaja s direktno uronjenom sondom frekvencije 20 kHz, nešto slabiji učinak u ultrazvučnoj kupelji (45 kHz) te najslabiji klasičnom ekstrakcijom. Kod ekstrakcije ružmarinske kiseline je obrnuta situacija gdje je pri istim uvjetima ekstrakcije primjenom metanola ekstrahirani veći udio što se pripisuje većoj polarnosti kiseline. Izbor otapala ne ovisi samo o odabranom postupku ekstrakcije već i polarnosti ekstrahiranih spojeva.

Pan i sur. (2012) proučavali su ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE) za ekstrakciju flavonoida iz sjemena gloga. Korišteni su sljedeći parametri: temperatura 65 °C, vrijeme ekstrakcije 37 minuta i 72 % etanola. Pod optimalnim uvjetima prinos flavonoida je bio $16,45 \pm 0,02$ mg/g. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da UAE bila učinkovita, pouzdana i izvediva za ekstrakciju flavonoida iz sjemena gloga.

Tahirović i Bašić (2014) ispitivali su plodove *Cratageus monogyna* kao izvor fenolnih spojeva s dobrom antioksidacijskom aktivnošću. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta. Najveći sadržaj bioaktivnih spojeva je određen u ekstraktima s 80 % metanolom, dok je najmanji sadržaj određen u ekstraktu s čistom vodom. Sadržaj ukupnih fenola se kretao od 2.01 do 4.60 mg GAE g⁻¹ s.u. (svježeg uzorka).

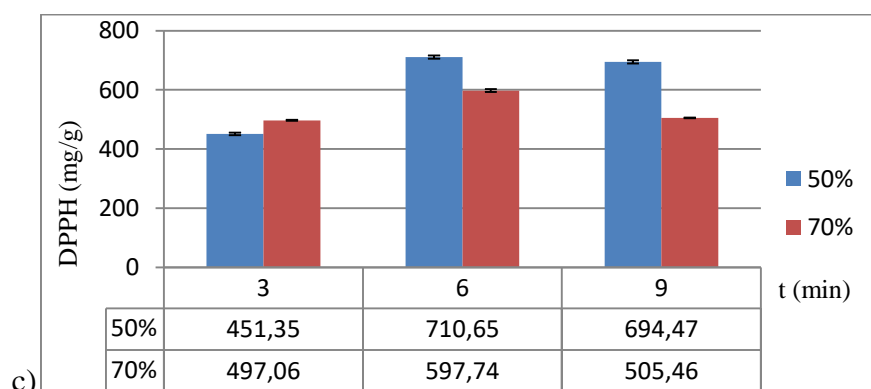
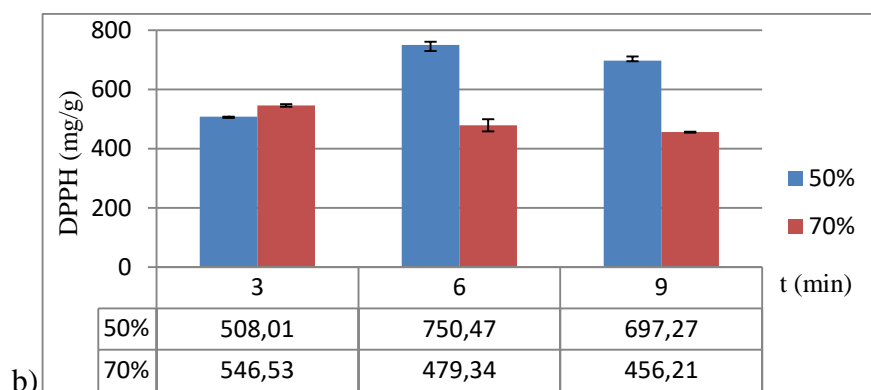
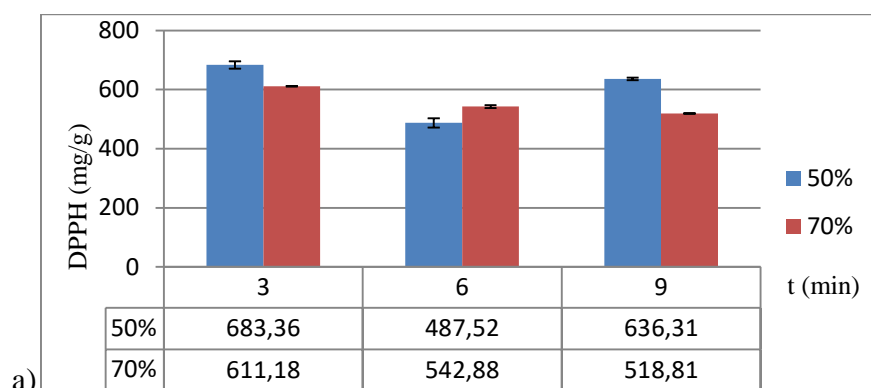
Rezultati naših i navedenih istraživanja nažalost se ne mogu uspoređivati zbog različitog supstrata i/ili uvjeta ekstrakcije.

Tablica 2. Statistička analiza (ANOVA) za ukupne fenole

Izvor varijacije	P
Otapalo	0,000345
Amplituda	0,000009
Polarnost	0,002225
Vrijeme	0,037860

Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) vrsta i polarnost otapala te povećanje vremena i amplitude imaju značajan utjecaj na maseni prinos ukupnih fenola.

4.2 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM



Slika 11. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom iz cvijeta i lista gloga (mgAAE g^{-1}) dobivena primjenom UAE uz primjenu 50 % i 70 % vodenih otopina etanola pri vremenu od 3, 6 i 9 minuta.

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

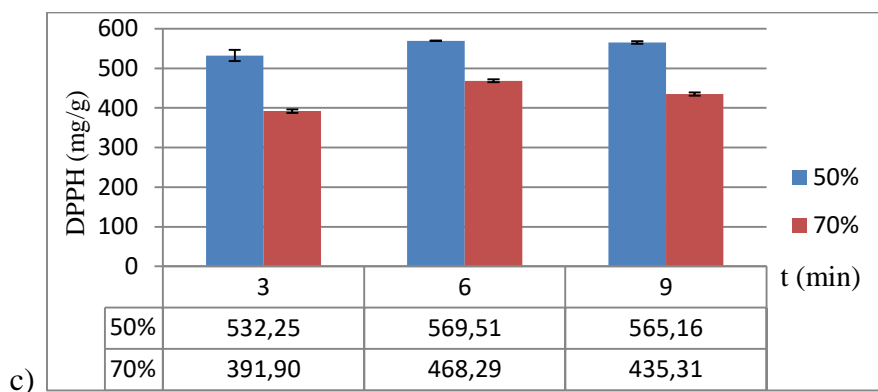
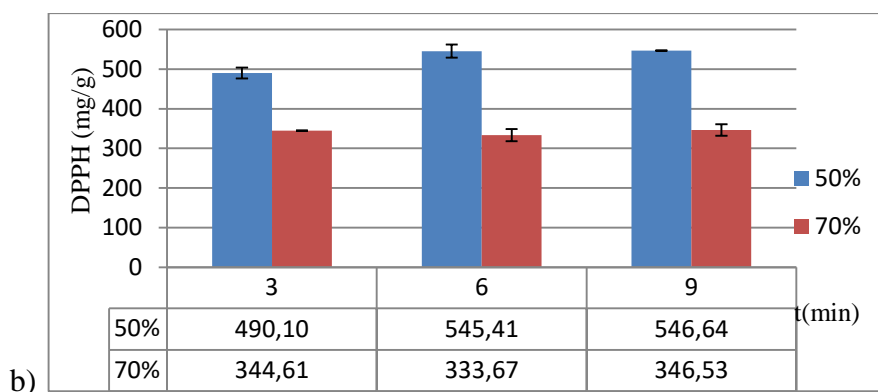
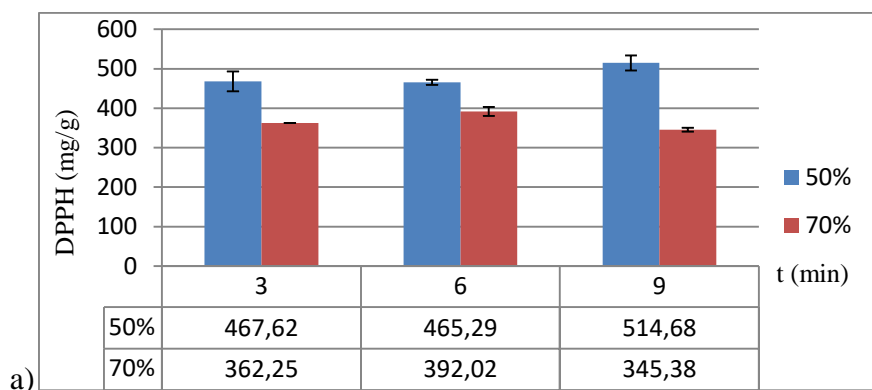
Primjenom 50 i 70 % vodenih otopina etanola, kroz vrijeme ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta, pri amplitudama 50, 75 i 100 % na slici 11. prikazana je antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) (mgAAE g⁻¹) primjenom UAE.

a) Pri amplitudi 50 % postignuta je najveća vrijednost (683,36 mgAAE g⁻¹), uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola, u trećoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (487,52 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u šestoj minuti ekstrakcije. Povećanje vremena ekstrakcije nije utjecalo na povećanje vrijednosti AA.

b) Pri amplitudi 75 % postignuta je najveća vrijednost (750,47 mgAAE g⁻¹) uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (456,21 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola u devetoj minuti ekstrakcije.

c) Pri amplitudi 100 % postignuta je najveća vrijednost (710,65 mgAAE g⁻¹), uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (451,35 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije.

Uzimajući u obzir sve tri ispitivane amplitude najveća vrijednost je 750,47 mgAAE g⁻¹, postignuta je uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola pri amplitudi 75 % u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost postignuta pri amplitudi 100 % uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije i iznosi 451,35 mgAAE g⁻¹. Vrijeme je različito utjecalo na povećanje vrijednosti AA ovisno o drugim parametrima ekstrakcije. Uz upotrebu ekstrakcijskog otapala s većim udjelom otapala (70 %) dobivene vrijednosti AA su manje.



Slika 12. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom iz cvijeta i lista gloga (mgAAE g^{-1}) dobivena primjenom UAE uz primjenu 50 % i 70 % vodenih otopina metanola pri vremenu od 3, 6 i 9 minuta.

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

Primjenom 50 i 70 % vodenih otopina metanola, kroz vrijeme ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta, pri amplitudama 50, 75 i 100 % na slici 12. prikazana je antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) (mgAAE g⁻¹) primjenom UAE.pri amplitudama 50, 75 i 100 %.

- a) Pri amplitudi 50 % postignuta je najveća vrijednost (514,68 mgAAE g⁻¹) uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u devetoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (345,38 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola u devetoj minuti ekstrakcije.
- b) Pri amplitudi 75 % postignuta je najveća vrijednost (546,64 mgAAE g⁻¹), uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u devetoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (333,67 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola u šestoj minuti ekstrakcije.
- c) Pri amplitudi 100 % postignuta je najveća vrijednost (569,51 mgAAE g⁻¹) uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (391,90 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola u trećoj minuti ekstrakcije.

Uzimajući u obzir sve tri ispitivane amplitude najveća vrijednost je 569,51 mgAAE g⁻¹, postignuta je uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola pri amplitudi 100 % u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost postignuta pri amplitudi 75 % uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola u šestoj minuti ekstrakcije i iznosi 333,67 mgAAE g⁻¹. Povećanje amplitude utjecalo je na povećanje vrijednosti AA, a vrijeme je neznatno utjecalo. Kod upotrebe ekstrakcijskog otapala s manjim udjelom metanola dobivene su veće vrijednosti, dok kod otapala s većim udjelom etanola imamo manje vrijednosti.

Uspoređujući dva otapala etanol i metanol (50 % i 70 % vodene otopine) najveća vrijednost je dobivena koristeći 50 % etanol pri amplitudi 75 % u šestoj minuti ekstrakcije (750,47 mgAAEg⁻¹). Kao bolje otapalo kod svih ekstrakata pokazala se 50 % vodena otopina. Povećanje udjela alkohola i vremena ekstrakcije nije rezultiralo bitno većim vrijednostima,.

d'Alessandro i sur. (2012) su ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom (UAE) proučavali su antioksidacijske polifenole iz plodova *Aronia melanocarpa*. Istraživana je kinetika ekstrakcije i prinosi ekstrakcije pod utjecajem različitih parametara (vrijeme i temperatura ekstrakcije, sastav otapala, omjer krutog otapala, veličina čestica, i ultrazvučno zračenje). Uočen je

vrlojasan učinak ultrazvuka (do 85 % povećanja prinosa ekstrahiranih polifenola). Visoke temperature i prisutnost etanola u otapalu uvelike su poboljšali postupak ekstrakcije. Visoka antioksidacijska aktivnost ekstrakata utvrđenih DPPH testovima potvrdili suprikladnost UAE za dobivanje biljnih ekstrakata bogatih antioksidansima. Uočena je vrlo dobra korelacija između koncentracije polifenola u ekstraktima i pripadajućim antioksidacijskim djelovanjem.

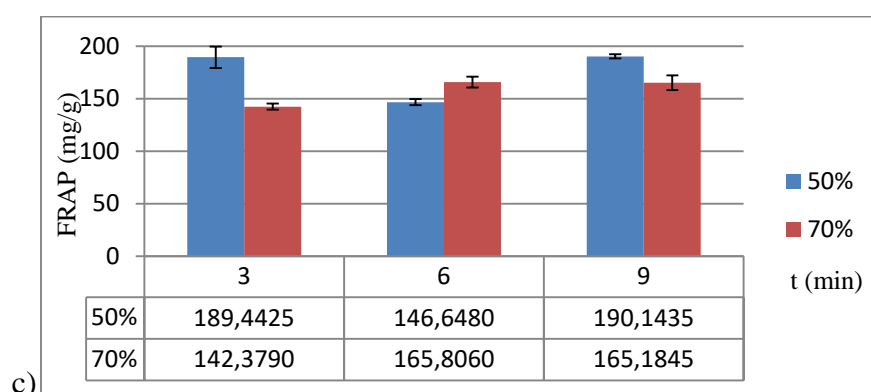
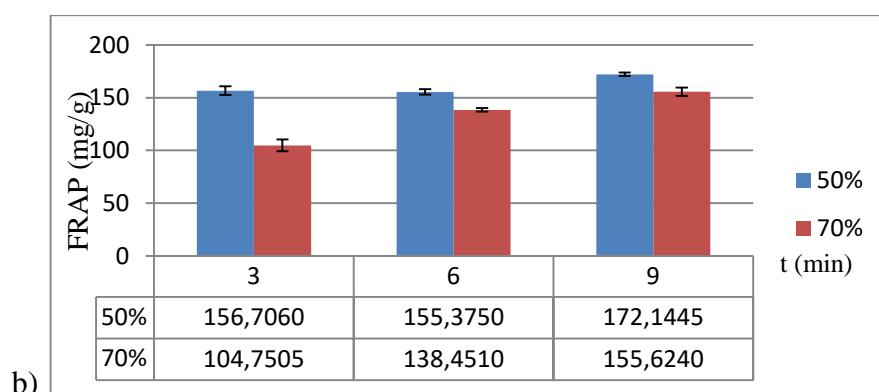
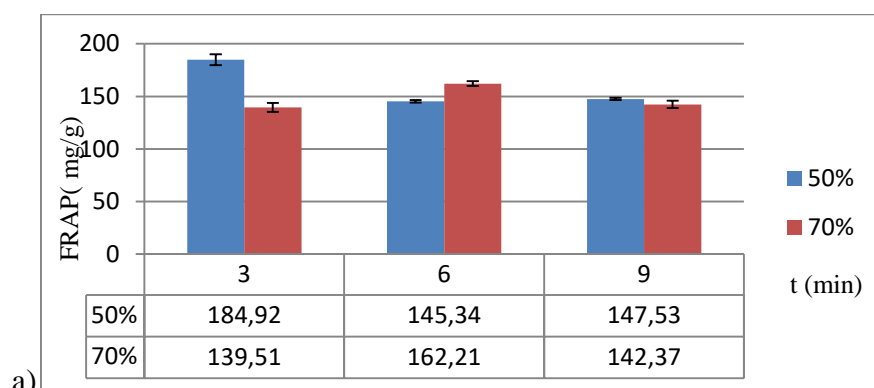
Tahirović i Bašić (2014) ispitivali su antioksidacijsku aktivnost ekstrakata *C. monogyna* dobivenih s otapalima različite polarnosti pomoću DPPH metode. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata je varirala od 0.661 do 2.524 mg AA g⁻¹ s.u. Najnižu inhibiciju pokazao je ekstrakt vode, dok je najvišu inhibiciju pokazao ekstrakt dobiven s 80 % metanolom. Izuzev vodenog ekstrakta (I = 24.48 %) i ekstrakta u čistom etanolu (I = 37.64 %), svi ostali ispitivani ekstrakti su pokazali visok stupanj inhibicije koji se kretao od 65.01% do 91.15 %. Osim vode i čistog etanola, svi ispitivani ekstrakti pokazali su snažno vezanje kisika na DPPH radikal. Za antioksidacijsku vrijednost je uočeno da se smanjuje s povećanjem sadržaja etanola u ekstraktima. Također je uočeno da se antioksidacijska vrijednost povećava s povećanjem sadržaja metanola u ekstraktima. Određena je visoka korelacija između antioksidacijske aktivnosti ekstrakata i sadržaja ukupnih fenola ($R^2 = 0.9473$), kao i sadržaja ukupnih proantocijanidina ($R^2 = 0.7469$).

Tablica 3. Statistička analiza (ANOVA) za antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom

Izvor varijacije	P
Otapalo	0,000000
Amplituda	0,036839
Polarnost	0,000000
Vrijeme	0,019244

Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) vrsta i polarnost otapala te povećanje vremena i povećanje amplitude imaju značajan utjecaj na vrijednosti AA.

4.3 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM



Slika 13. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iz cvijeta i lista gloga (mgAAE g^{-1}) dobivena primjenom UAE uz primjenu 50 % i 70 % vodenih otopina etanola pri vremenu od 3, 6 i 9 minuta.

a) uz amplitudu 50 %

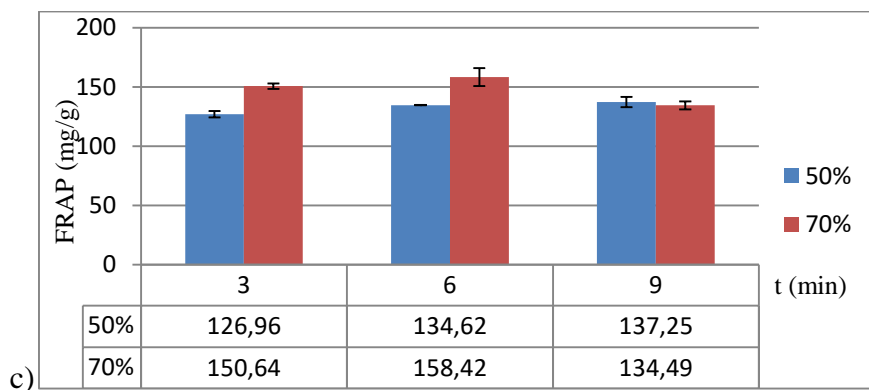
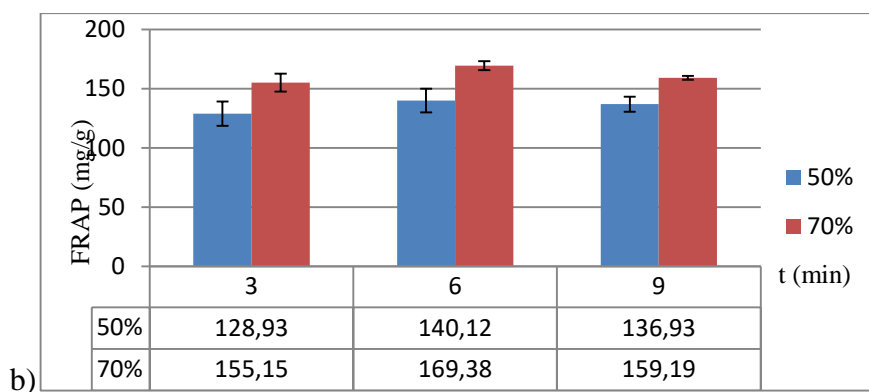
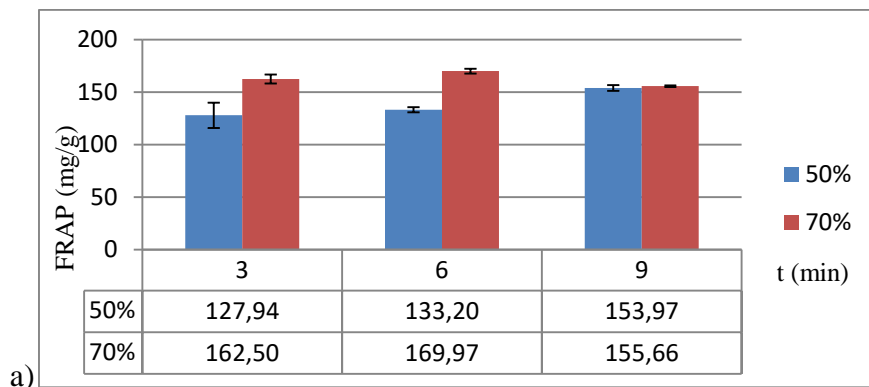
b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

Primjenom 50 i 70 % vodenih otopina etanola, kroz vrijeme ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta, pri amplitudama 50, 75 i 100 % na slici 13. prikazana je antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) (mgAAE g⁻¹) primjenom UAE. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti visoke su u svim uzorcima.

- a) Pri amplitudi 50 % postignuta je najveća vrijednost (184,92 mgAAE g⁻¹) uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije te je minimalna vrijednost (139,5135 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije.
- b) Pri amplitudi 75 % najveća vrijednost (172,1445 mgAAE g⁻¹) postignuta je uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u 9 minuti ekstrakcije, a minimalna vrijednost (104,75 mgAAE g⁻¹) postignuta je uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije.
- c) Pri amplitudi 100 % najveća vrijednost (190,14 mgAAE g⁻¹) postignuta je uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola u devetoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (142,37 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije i iznosi 142,37 mgAAE g⁻¹.

Uzimajući u obzir sve tri ispitivane amplitude najveća vrijednost 190,14 mgAAE g⁻¹, postignuta je uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola, pri amplitudi 100 % u devetoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (139,51 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 70 % vodene otopine etanola u trećoj minuti ekstrakcije. Vrijeme nije značajno utjecalo na povećanje vrijednosti AA. S 50 % vodenom otopinom dobivena je najveća vrijednost AA, pa je 50 % vodena otopina etanola bolja od 70 % vodene otopine etanola.



Slika 14. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iz cvijeta i lista gloga (mgAAE g^{-1}) dobivena primjenom UAE primjenu 50 i 70 % vodenih otopina metanola pri vremenu od 3, 6 i 9 minuta.

a) uz amplitudu 50 %

b) uz amplitudu 75 %

c) uz amplitudu 100 %

Primjenom vodenih otopina metanola (50 i 70 %), kroz vrijeme ekstrakcije 3, 6 i 9 minuta, pri amplitudama 50, 75 i 100 % na slici 14. prikazna je antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iz cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*) (mgAAE g⁻¹) primjenom UAE.

- a) Pri amplitudi 50 % najveća vrijednost (169,97 mgAAE g⁻¹) postignuta je uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost postignuta uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u trećoj minuti ekstrakcije. Vrijeme nije imalo velikog utjecaja na vrijednosti AA kod upotrebe 50 % vodene otopine metanola, povećanjem vremena došlo je do laganog povećanja vrijednosti AA.
- b) Pri amplitudi 75 % najveća vrijednost (169,38 mgAAE g⁻¹) postignuta je uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola, u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (128,93 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u trećoj minuti ekstrakcije. Vrijeme je neznatno utjecalo na vrijednosti AA. Povećanjem polarnosti otapala došlo je do povećanja vrijednosti AA.
- c) Pri amplitudi 100 % najveća vrijednost (158,42 mgAAE g⁻¹) postignuta je uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost (126,96 mgAAE g⁻¹) postignuta uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u trećoj minuti ekstrakcije.

Najveća vrijednost je 169,97 mgAAE g⁻¹, postignuta je uz upotrebu 70 % vodene otopine metanola, pri amplitudi 50 % u šestoj minuti ekstrakcije, dok je minimalna vrijednost postignuta uz upotrebu 50 % vodene otopine metanola u trećoj minuti ekstrakcije pri amplitudi 100 % i iznosi 126,96 mgAAE g⁻¹. Vrijeme nije značajno utjecalo na povećanje vrijednosti AA. Sa 70 % vodenom otopinom metanola dobivena je najveća vrijednost AA, pa se ono pokazalo boljim otapalom od 50 % vodene otopine metanola.

Uspoređujući otapala koja su korištena (50 i 70 % vodene otopine metanola i etanola) može se zaključiti da se za vrijednosti AA FRAP metodom boljim otapalom pokazao etanol, ali povećanje udjela etanola nije utjecalo na povećanje vrijednosti AA. Kod metanola, boljim se pokazala 70 % otopina u odnosu na 50 % otopinu metanola, što znači da je u ovom slučaju povećanje udjela alkohola utjecalo na povećanje vrijednosti AA.

Nažalost dobivene rezultate teško je usporediti s podacima iz literature zbog primjenjenih različitih načina ekstrakcije i izražavanja rezultata.

Chavan i Singhal (2013) proveli su istraživanje na odvajanju polifenola iz biljke *Areca catechu* L. pomoću 80 % acetona s pH 4.0 kao otapala za ekstrakciju uz ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (snaga ultrazvuka od 30 W, A radni ciklus od 50% i vrijeme ekstrakcije od 50 min). Uz navedenu ekstrakciju ostvaren je prinos ukupnih polifenola 362,59 mgGAE g⁻¹, ukupnih tanina 89,24 mgCE g⁻¹ i antioksidacijsko djelovanje pomoću FRAP testa 1039,11 mM TEAC.

Shortle i sur. (2014) proveli su istraživanje u kojem se FRAP metodom određivao antioksidacijski kapacitet u ekstraktima lista i cvijeta te ploda gloga. Ekstrakti su dobiveni konvencionalnom ekstrakcijom-maceracijom, ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i ekstrakcijom superkritičnim fluidom (CO₂). Kao otapalo koristili su 45 % vodenu otopinu etanola. Najviši antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktima cvijeta i lista gloga dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (1630,99 ± 8,99 mg AAE/L). A nešto niži antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktima lista i cvijeta dobivenim konvencionalnom ekstrakcijom (955,84 ± 42,74 mgAAE/L). Najniži antioksidacijski kapacitet je određen u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom superkritičnim fluidom (232,41 ± 10,18 mg AAE/L). Antioksidacijski kapaciteti u svim ekstraktima ploda su bili znatno niži u odnosu na ekstrakte cvijeta i lista. Razlog tome su veće koncentracije flavonoida i fenolnih kiselina u listu i cvijetu u odnosu na plod gloga.

Tablica 4. Statistička analiza (ANOVA) za antioksidacijsku aktivnost FRAP metodom

Izvor varijacije	P
Otapalo	0,001199
Amplituda	0,210606
Polarnost	0,636125
Vrijeme	0,140474

Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) vrsta otapala ima značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, dok polarnost otapala i povećanje amplitude i vremena nemaju značajan utjecaj na vrijednosti AA.

5. ZAKLJUČCI

Proučavajući utjecaj vrste otapala na izolaciju fenolnih spojeva iz mješavine cvijeta i lista gloga (*Crataegi folium cum flore*), došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Etanol je u usporedbi sa metanolom bolje ekstrakcijsko otapalo za izolaciju fenolnih spojeva iz mješavine cvijeta i lista gloga te su u ekstraktima dobivenim s etanolom, određene veće vrijednosti ukupnih fenola, te antioksidacijska aktivnost dobivena DPPH i FRAP metodom.
2. Za etanol kao bolje ekstrakcijsko otapalo za ukupne fenole uglavnom je učinkovitiji udio od 70 %, a za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom učinkovitiji je udio od 50 %.
3. Prema rezultatima statističke analize (ANOVA) vrsta i polarnost otapala te vrijeme i amplituda imaju značajan utjecaj na maseni prinos ukupnih fenola i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, dok na vrijednosti FRAP metodom jedino vrsta otapala ima značajan utjecaj.
4. Optimalni uvjeti izolacije fenola i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti iz mješavine cvijeta i lista gloga uz primjenu ultrazvukom potpomognute ekstrakcije te najviši prinosi ostvaruju se pri sljedećim uvjetima:
 - najveći prinosi fenola 95,66 mgGAE g⁻¹ ostvareni uz 70 % etanol, pri amplitudi 100 % i trajanju ekstrakcije 6 minuta,
 - antioksidacijska aktivnost DPPH metodom 750,47 mgAAE g⁻¹ uz 50 % etanol, pri amplitudi 75 % i trajanju ekstrakcije 6 minuta,
 - antioksidacijska aktivnost FRAP metodom 190,14 mgAAE g⁻¹ uz 50 % etanol, pri amplitudi 100 % i trajanju ekstrakcije 9 minuta.

6. LITERATURA

- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrason Sonochem.* **11**, 261–265.
- Anonymus 1 (2016) <<http://www.plantea.com.hr/glog/>> Pristupljeno 29.6.2016
- Anonymus 2 (2016) <<http://alibunar.org.rs/mdfa/files/Najzastupljenije%20biljne%20vrste.pdf>> Pristupljeno 29.6.2016
- Anonymus 3 (2016) <https://www.google.ba/search?q=cvijet+i+plod+gloga&hl=bs&biw=1366&bih=631&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiMxbni7czNAhVLwBQKHd9gC9MQ_AUIBi_gB#imgsrc=Vu04g82XRQjn8M%3A> Pristupljeno 29.6.2016.
- Anonymus 4 (2016) <<http://www.agroklub.com/vocarstvo/glog-prijatelj-srca-koji-ne-trazi-puno-brige/22579/>> Pristupljeno 22.9.2016
- Anonymus 5 (2016) <<http://www.koval.hr/blogeky/ljekovite%20biljke/glog.html>> Pristupljeno 22.9.2016
- Anonymus 6 (2016) <https://en.wikipedia.org/wiki/Crataegus_laevigata> Pristupljeno 22.9.2016
- Blekić, M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3** (1) 32-47.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D. i sur. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. **4** (1-2), 32-37.
- Brnčić, M., Karlović, S., Rimac Brnčić, S., Penava, A., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B. (2010) Textural properties of infra-red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatment. *Afr. J. Biotech.* **9** (41), 6907.
- Chavan, Y., Singhal, R.S. (2013) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **17**, 106–113.

- d'Alessandro, L.G., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K., (2013) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology* **93**, 42–47.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B., Mofardin, I. (2013) Ultrasound-assisted infrared drying of Pear slices: textural issues. *J. Food Process. Eng.* **36**, 397
- Edwards, E. J., Brown, N. P., Talent, N., Dickinson, T.A., Shipley, P.R. (2012) A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* **79**, 5-26.
- Fong, H.H.S., Bauman, J. L., (2002) Hawthorn. *Journal of Cardiovascular Nursing* **16**(4), 1-8.
- Franjić, J., Škvorc, Ž., Čarni, A. (2006) Rasprostranjenost Panonskog Crnog gloga (*Crataegus nigra* Waldst. et Kit.) u Hrvatskoj i njegov značaj u formiranju vegetacije šumskih rubova. *Šumarski list* br. 1–2, 3-8.
- Froehlicher, T., Hennebelle, T., Martin-Nizard, F., Cleenewerck, P., Hilbert, J., Trotin, F., Grec, S. (2009) Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem.* **115**(3), 897–903.
- García-Mateos, R., Ibarra-Estrada, E., Nieto-Angel, R. (2013) Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**, 1298-1304.
- Gundogdu, M., Ozrenk, K., Ercisli, S., Kan, T., Kodad, O., Hegedus, A. (2014) Organic acids, sugars, vitamin C content and some pomological characteristics of eleven hawthorn species (*Crataegus* spp.) from Turkey. *Biol. Res.* **47**, 1-5.
- Halliwell, B. (1990) How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research Communications* **9**(1), 1-32.
- Harborne JB, Baxter H. Handbook of natural flavonoids. Chichester, UK: Wiley & Sons; 1999.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Jambrak Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Possibility of application high intensity ultrasound in milk industry. *Mljekarstvo*. **59**, 65.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits vegetables. *Food Chemistry* **126** 1821–1835.

- Kašloniene V, Venskutonis PR. Floral Markers in honey of Various Botanical and Geographic Origin: A Review. Comprehensive reviews in food science and food safety; 2010.
- Kazazić S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279-290.
- Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P.B., Warber, S., Bolling, S., Chang, S.C. (2003) Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J. Agric.Food Chem.***51**, 3973-3976.
- Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A. G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.***71**, 214–222.
- Lelas, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo*, **56** (4), 311-330.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwaveassisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem.* **15**, 731-737.
- Liu, P., Yang, B. and Kallio, H. (2011) Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11141–11145.
- Machieux, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Osawa, T. (1994) “Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems,” in *Postharvest Biochemistry of Plant Food-Materials in the Tropics*, I. Uritani, V. V. Garcia, and E. M. Mendoza, Eds., pp. 241–251, Japan Scientific Societies Press.
- Ozcan, M., Haciseferogullari, H., Marakoglu, T., Arslan, D. (2005) Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit: Some physical and chemical properties. *J. Food Eng.* **69**, 409–413.

- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., Qiao, J. (2012) Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason. Sonochem.* **19**, 486-490.
- Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T.J., Cole, R. (2009) The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* **16**, 287–292.
- Prinz, S., Ringl, A., Huefner, A., Pemp, A., Kopp, B. (2007) 4'''-Acetylvitexin-2''-O-rhamnoside, Isoorientin, Orientin, and 8-Methoxykaempferol-3-O-glucoside as Markers for the Differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae) **4** (12) 2920–2931.
- Režek Jambrak, A., Lelas V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z., (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kem. Ind.* **59** (4) 169–177.
- Ringl, A., Prinz, S., Huefner, A., Kurzmann, M., Kopp, B. (2007). Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (R)- and (S)-eriodictyol-7-O-glucuronide and luteolin-7- O-glucuronide. *Chemistry & Biodiversity*, **4**(2), 154–162.
- Sun, T. and Ho, C. (2005) Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem.* **90**, 743–749.
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Tuominen, J., Kokkonen, J., Rauha, J.P., Laakso, I., Hiltunen, R. (2002) Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry* **60**, 821–825.
- Swain T, Harborne JB, Sumere CF. Biochemistry of Plant Phenolics, Recent Advances in Phytochemistry. New York, SAD: Plenum Press; 1979.
- Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat. Sci.* **98**, 828-834.
- Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Rimac Brnčić, S. (2015) Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int. Agrophys.* **29**, 231-237.

- Tahirović, A., Bašić, N. (2014) Phenolic content and antioxidant activity of crataegus monogyna l. Fruit extracts. *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo No.2* , (29-40)
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. **2**, 1231-1246.
- Wloch, A., Kapusta, I., Bielecki, K., Oszmianski, J., Kleszczynska, H. (2013) Activity of hawthorn leaf and bark extracts in relation to biological membrane. *J. Membrane Biol.* **246**, 545-556.
- Zhang, Z., Chang, Q., Zhub, M., Huang, Y., Ho, W.K.K., Chen, Z-Y. (2001) Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *J of Nutritional Biochem* **12**, 144–152.

